AUFARBEITUNG UND DERIVATISIERUNG VON AMINEN ZUM GASCHROMATOGRAPHISCHEN NACHWEIS AUS BIOLOGISCHEN FLÜSSIGKEITEN

DISSERTATION

zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften
der Fakultät für Chemie und Pharmazie
der Eberhard-Karls-Universität zu Tübingen

vorgelegt von

VOLKER HORSTMANN

aus Stuttgart

1983

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41547616_0003

AUFARBEITUNG UND DERIVATISIERUNG VON AMINEN ZUM GASCHROMATOGRAPHISCHEN NACHWEIS AUS BIOLOGISCHEN FLÜSSIGKEITEN

DISSERTATION

zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften
der Fakultät für Chemie und Pharmazie
der Eberhard-Karls-Universität zu Tübingen

vorgelegt von

VOLKER HORSTMANN

aus Stuttgart

1983

Die vorliegende Arbeit wurde unter Leitung von Herrn Professor Dr. Günter Häfelinger in der Zeit von Juni 1981 bis November 1983 am Institut für organische Chemie der Eberhard-Karls-Universität Tübingen durchgeführt.

Meinem verehrten Lehrer, Herrn Professor Dr. Günter Häfelinger, danke ich für die Stellung des Themas und die Unterstützung während der Durchführung dieser Arbeit.
Dem Institutsdirektor, Herrn Prof. Dr. Ernst Bayer, danke ich für die Überlassung von Institutseinrichtungen.
Mein weiterer Dank gilt den Kollegen des Arbeitskreises für die stete Diskussionsbereitschaft und die gute Zusammenarbeit.

Abstract

Horstmann, Volker

AUFARBEITUNG UND DERIVATISIERUNG VON AMINEN ZUM GASCHROMATOGRAPHISCHEN NACHWEIS AUS BIOLOGISCHEN FLÜSSIGKEITEN

Bei der Reduktion von Pyridostigmin mit Natriumborhydrid in wässriger Lösung entstehen neben dem 1,2,5,6-Tetrahydroprodukt, welches zu 80% gebildet wird, die 1,2,3,6-Tetrahydroverbindung sowie das im Ring völlig gesättigte Produkt. Durch Umsetzung in organischen Lösungsmitteln konnte einheitliche Produktführung erreicht werden. Die Reaktion wurde angewendet zum gaschromatographischen Nachweis von 1 µg/ml Pyridostigmin aus Blutserum.

Mit Trifluoressigsäureanhydrid bilden methylierte Tryptamine einheitliche Derivate bei 60°C/10Min. Die N,N-dimethylierten Indolamine ergeben mit diesem Reagenz keine flüchtigen Derivate, sondern quartäre Ammoniumverbindungen durch Trifluoracetylierung des methylierten Seitenkettenstickstoffs. Erfolgreich verläuft hier die Derivatisierung mit N-Methyl-bis-trifluoracetamid, wobei N,N-Dimethyltryptamin und Bufotenin bei 95°C/2h einheitliche Trifluoracetylderivate ergeben. Mit Trifluoracetylimidazol ist für sämtliche Indolamine einheitliche Produktführung bei 60°C/20Min. möglich, doch stört überschüssiges Reagenz bei der nachfolgenden Analyse.

Die Isolierung der Indolamine aus dem Harn verläuft über deren Adsorption an XAD-4 Harz und Elution mit Methylenchlorid/Methanol/Eisessig 5:4:1 nach Waschen des Harzes mit Wasser. Weitere Auftrennung erfolgt durch Flüssig/Flüssig-Extraktion und präparative Dünnschichtchromatographie mit Methanol als Fließmittel.

Nach diesen Aufarbeitungsgängen sowie Derivatisierung ist gaschromatographischer Nachweis mit Flammenionisationsdetektor möglich. N-Methyltryptamin und Tryptamin wurden in Konzentrationen von 1 µg|500ml Urin auf diese Weise nachgewiesen.

INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
Einleitung	1
I. Untersuchung der Reaktionsprodukte der Reduktion von Pyridostigmin mit Natriumborhydrid und Versuche zur Optimierung der Reaktion	4
1. Problemstellung	4
2. Struktur der Reaktionsprodukte	7
2.1 Hauptprodukt	7
2.2 Nebenprodukte	17
3. Optimierung der Reaktionsbedingungen	30
3.1 PH-Wert der wässrigen Lösung	32
3.2 Temperatur und Zeit	32
3.3 Umsetzung in organischen Lösungsmitteln	33
4. Probenaufarbeitung und Nachweis von Pyridostigmin aus Blutserum	34
II. Gaschromatographische Analyse von Indolaminen im Harn	38
1. Problemstellung	38
2. Derivatisierungsversuche mit Trifluoracetylierungs-reagenzien	49
2.1 Allgemeine Bemerkungen	49
2.2 Derivatisierung mit TFAA	52
2.3 Derivatisierung mit MBTFA	70
2.4 Derivatisierung mit TFAI	73
2.5 Eigenschaften der Trifluoracetylderivate	77

2.6 Spektroskopische Untersuchungen 79

2.6.1 Massenspektren 79

2.6.2 IR-Spektren 86

2.6.3 ^{1}H-NMR-Spektren 94

2.6.4 ^{13}C-NMR-Spektren 101

2.6.5 ^{19}F-NMR-Spektren 105

2.7 Diskussion der Ergebnisse 111

3. Aufarbeitung des Harns 113

3.1 Allgemeine Bemerkungen 113

3.2 Hydrolyse der Aminkonjugate 115

3.3 Ionenaustauschchromatographie 115

3.4 Vortrennung an XAD-4 Harz und Sephadex 118

3.5 Flüssig/Flüssig-Extraktion 122

3.6 Präparative Dünnschichtchromatographie 127

3.7 Fließdiagramm der Urinaufarbeitung 130

4. Nachweis von Indolaminen aus dem Harn 132

III. Experimenteller Teil 137

1. Allgemeines 137

1.1 Geräte 137

1.2 Chemikalien 139

2. Versuche zu Kapitel I 141

2.1 Umsetzung von Pyridostigmin mit Natriumborhydrid unter verschiedenen Bedingungen 141

2.2 Darstellung von 1-Methyl-3-(N,N-Dimethylcarbamoyl)-1,2,5,6-Tetrahydropyridin (12) 141

2.3 Darstellung der Nebenprodukte 142

2.4 Darstellung von Pyridostigmin 143

2.5 Darstellung von Pyridostigminpikrat 144

2.6 Aufarbeitung des Serums 144

3. Versuche zu Kapitel II 146

3.1 Darstellung der Indolamine 146

3.2 Darstellung der Derivatisierungsreagenzien 149

3.3 Präparative Darstellung der Trifluoracetyl-derivate 152

3.4 Umsetzung w-N,N-Dimethylierter Arylalkyl-amine mit TFAA 154

3.5 Umsetzung von Indolaminen mit verschiedenen Derivatisierungsreagenzien im analytischen Rahmen 155

3.6 Adsorption von Indolaminen an IRC 50 Ionentauscher 156

3.7 Versuche mit XAD-Harzen 157

3.8 Bestimmung des Extraktionsgleichgewichtes 157

3.9 Urinaufarbeitung und Nachweis von Indolaminen 158

4. Belegung von Glaskapillarsäulen 160

4.1 Belegung mit Methylsilicon OV 101 160

4.2 Belegung mit Polyethylenglykol Carbowax 20M 160

IV. Zusammenfassung 162

V. Literatur 165

ABKÜRZUNGEN:

DMT	N,N-Dimethyltryptamin (7)
ECD	Elektron Capture Detector
FCNP	Nitroprussid-Natrium-Kaliumhexacyanoferrat (III)
FID	Flame Ionisation Detektor
GC/MS	Gaschromatographie gekoppelt mit Massenspektrometrie
MAO	Monoaminoxidase
MBTFA	N-Methyl-Bis-Trifluoracetamid
NMT	w-N-Methyltryptamin (3)
PND	Stickstoff-Phosphor-Detektor
TFA	Trifluoressigsäure
TFAA	Trifluoressigsäureanhydrid
TFAI	N-Trifluoracetylimidazol
RP	Reversed Phase
MSTFA	N-Methyl-N-trimethylsilyltrifluoracetamid
BSTFA	Bis-trimethylsilyl-trifluoracetamid
HMDS	Hexamethyldisilazan
SAM	S-Adenosylmethionin
Ehrlich-reagenz	p-Dimethylaminobenzaldehyd

EINLEITUNG.

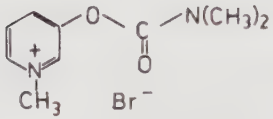
Der Nachweis organischer Substanzen aus biologischen Flüssigkeiten wie Blut und Urin stellt ein unumgängliches Hilfsmittel sowohl für die medizinische Forschung als auch für die routinemäßige Überwachung von Patienten in Krankheitsfällen dar. Immer größer wird die Bedeutung der Analytik in diesem Bereich, seit es durch die Entwicklung moderner chromatographischer Methoden wie GC und HPLC möglich ist, Spuren von Verbindungen bis in niedrigste Bereiche nachzuweisen.

Dennoch werfen vor allem polare und hier besonders die basischen Verbindungen große Probleme auf: Aufgrund der großen Anzahl solcher Komponenten vor allem im Harn ist die Vortrennung und Anreicherung aufwendig und oft mit erheblichen Substanzverlusten behaftet. Weiterhin zeigen basische Verbindungen wegen ihrer Adsorptionseigenschaften ein ungünstiges chromatographisches Verhalten, so daß meist ein Derivatisierungsschritt vor die eigentliche Analyse geschaltet werden muß.

Andererseits sind es aber gerade diese Substanzen, welche im Blickpunkt des Interesses stehen. Viele Arzneimittel enthalten stickstoffhaltige Molekülteile und im Körper selbst werden zahlreiche Amine endogen gebildet.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden zwei Probleme behandelt, die auf den ersten Blick keine Gemeinsamkeiten aufweisen, aber im logischen Vorgehen bei der Lösung der Aufgabe Verwandtschaft zeigen.

Der erste Teil befaßt sich mit der Ausarbeitung eines Nachweisverfahrens für das Arzneimittel Pyridostigmin (Mestinon) im Blutplasma.



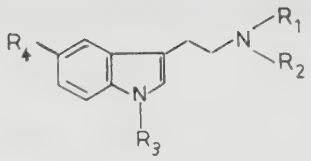
(1)

3-[(N,N-Dimethyl)-carbamoyl]-
1-methylpyridiniumbromid
= Pyridostigmin

Die in der Diplomarbeit [1] gefundene Derivatisierungsmöglichkeit durch Reduktion des Pyridiniumsalzes mit Natriumborhydrid war soweit zu optimieren, daß eine Anwendung im analytischen Rahmen möglich ist. Eine weitere Aufgabe bestand in der eindeutigen Aufklärung der drei entstehenden Reaktionsprodukte.

Im zweiten Teil der Arbeit wurden Möglichkeiten zur Abtrennung und Anreicherung von Indolaminen aus Harnproben untersucht. Des weiteren wurden verschiedene Trifluoracetylierungsreagenzien im Hinblick auf ihre Tauglichkeit zur einheitlichen Derivatisierung dieser Verbindungen getestet.

Folgende Indolamine wurden dabei ins Auge gefaßt:



R_1	R_2	R_3	R_4	Verbindung
H	H	H	H	(2) Tryptamin
H	CH_3	H	H	(3) N-Methyltryptamin
H	H	CH_3	H	(4) 1-Methyltryptamin
H	H	H	OCH_3	(5) 5-Methoxitryptamin
H	CH_3	H	OCH_3	(6) N-Methyl-5-methoxitrypt.
CH_3	CH_3	H	H	(7) N,N-Dimethyltryptamin
CH_3	CH_3	H	OCH_3	(8) 5-Methoxi-N,N-dimethyltr.
CH_3	CH_3	H	OH	(9) Bufotenin

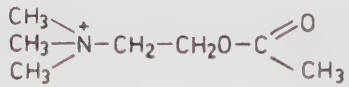
Im folgenden werden die beiden Problemstellungen in getrennten Kapiteln behandelt.

I. UNTERSUCHUNG DER REAKTIONSPRODUKTE DER REDUKTION VON PYRIDOSTIGMIN MIT NATRIUMBORHYDRID UND VERSUCHE ZUR OPTIMIERUNG DER REAKTION.

1. PROBLEMSTELLUNG.

Das Arzneimittel Pyridostigmin (1) wird bei der Behandlung der "Myasthenia gravis" eingesetzt, einer krankhaften Muskelermüdung aufgrund von Störungen der neuromuskulären Reizübermittlung. Dabei verhindert Pyridostigmin die zu schnelle Verseifung des Neurotransmitters Acetylcholin, welcher bei der Muskeltätigkeit freigesetzt wird, indem es selbst mit den esteratischen Zentren der Cholinesterase reagiert.

Um dieses Medikament in der richtigen Dosierung anwenden zu können, benötigt man ein quantitatives Analysenverfahren, mit dessen Hilfe die Konzentration von (1) routinemäßig aus Blutproben ermittelt werden kann.



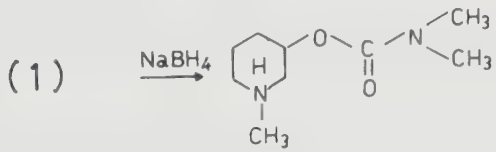
(10)

Acetylcholin

Ziel der Diplomarbeit [1] war es, ein solches Nachweisverfahren auszuarbeiten.

Da sich die nachzuweisenden Konzentrationen im Bereich von 10-50 ng/ml Blutserum bewegen, kamen nur GC oder HPLC zur

Trennung und Detektion in Frage. Da schon einige Autoren zu diesem Zeitpunkt Bestimmungen von (1) mit Hilfe der HPLC veröffentlicht hatten,[2-6] welche jedoch in der routinemäßigen Reproduzierbarkeit Schwierigkeiten bereiteten, wurde die Entwicklung eines gaschromatographischen Nachweisverfahrens in Angriff genommen. Hierbei bestand die Schwierigkeit zunächst darin, aus dem in dieser Form nicht zugänglichen Pyridiniumsalz ein flüchtiges, verdampfbares Derivat herzustellen, welches im GC erfassbar ist.
Die Lösung dieses Problems gelang durch Umsetzung von (1) mit einem Überschuß Natriumborhydrid in wässriger Lösung. Dieses Verfahren schien ideal zu sein, da die Reaktion direkt in der biologischen Flüssigkeit erfolgen konnte und das Produkt danach nur noch extrahiert zu werden brauchte.



Bei dieser Reduktion entstanden jedoch neben dem Hauptprodukt zu insgesamt 20% zwei Nebenprodukte.
Um die Reaktion trotzdem analytisch verwerten zu können, mußten die Bedingungen so optimiert werden, daß eine einheitliche Produktführung möglich war.
Durch Zugabe von Alkoholen zur wässrigen Reaktionslösung gelang es, die Bildung von Nebenprodukten auf etwa 10% zurückzudrängen. Zur weiteren Verbesserung dieser Methode war aber noch eine Überprüfung folgender Parameter notwendig:

- Einfluß des PH-Wertes.
- Reaktionsmedium.
- Temperatur und Zeit.

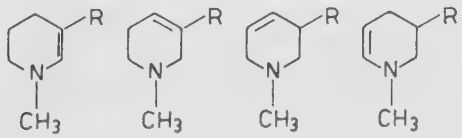
Die Optimierung dieser Reaktionsbedingungen sowie eine eindeutige Strukturaufklärung der bei der Reaktion entstandenen Produkte war erstes Teilziel der Dissertation.

2. STRUKTUR DER REDUKTIONSPRODUKTE.

Bei der Untersuchung der Reaktionsprodukte nach Extrahieren mit Ether erschienen im Gaschromatogramm drei Signale (siehe Abb.1). Das zuletzt Erscheinende stellt dabei mit ca. 80% das Hauptprodukt dar.

2.1 HAUPTPRODUKT.

Im GC/MS ergibt sich für das Hauptreduktionsprodukt von (1) ein M^+ -Peak von m/e 184.(Siehe S.26). Bei der entsprechenden N-Ethylverbindung tritt der M^+ - Peak bei m/e 198 auf.
In beiden Fällen erscheint ein intensives Signal bei m/e 72 ($CON(CH_3)_2$). Diese M^+ - Peaks entsprechen denjenigen Reaktionsprodukten, bei denen gerade eine Doppelbindung im Ring erhalten ist.
Für die Lage dieser Doppelbindung gibt es vier Möglichkeiten:



(11) (12) (13) (14)

R = $-O-C(=O)-N(CH_3)_2$

Davon kommen nur (11) und (12) weiter in Betracht, die Möglichkeiten (13) und (14) scheiden aufgrund folgender NMR-Untersuchungen aus:

1) Im H-gekoppelten ^{13}C - NMR - Spektrum müßte bei (13) und (14) im Bereich 0 bis 80 ppm (alicyclische Kohlenstoffatome) ein Dublett auftreten, welches vom C-Atom mit dem Rest R herrührt. Dies ist jedoch nicht der Fall, sondern es treten drei Tripletts und ein Quartett auf, was nur (11) oder (12) in Betracht kommen läßt.

2) (13) und (14) besitzen zwei olefinische Protonen, (11) und (12) nur ein olefinisches Proton. Das Integrationsverhältnis zwischen olefinischen und aliphatischen Protonen im ^1H - Spektrum ergibt, daß es sich nur um ein olefinisches Proton handeln kann.

Weitere Anhaltspunkte für die Unterscheidung zwischen (11) und (12) ergeben sich ebenfalls aus den NMR - Spektren:

A) ^1H - NMR - Spektren.

Chemische Verschiebung des Schwerpunktes der Signale des olefinischen Protons

freies Amin δ_{CH} = 5.43 ppm

Pikrat δ_{CH} = 5.66 ppm

d. folgt: $\Delta\delta$ = 0.23 ppm

Vergleich von Literaturangaben[7,8)]

$(C_2H_5)_3N$ δ_{CH_2} = 2.5 ppm

$(C_2H_5)_4N^+$ δ_{CH_2} = 3.5 ppm

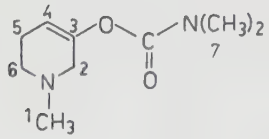
d. folgt: $\Delta\delta$ = 1 ppm

$C_6H_6N(CH_3)_2$ δ_{CH_3} = 2.85 ppm

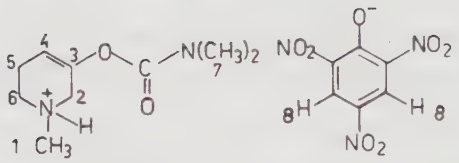
$C_6H_6N(CH_3)_3^+$ δ_{CH_3} = 3.72 ppm

d. folgt: $\Delta\delta$ =0.87ppm

Aus den Literaturangaben ist ersichtlich, daß die Tieffeldverschiebung von CH_2 - Gruppen, die dem Stickstoff benachbart sind, bei Positivierung desselben zwischen 0.85 und 1 ppm liegt.
Im Falle von (11) sollte also Δ_δ um einiges größer sein als 0.23 ppm. So wird hier das alicyclische Proton mit der größten Verschiebung im freien Amin im Pikrat um 0.91 ppm tieffeld verschoben, das alicyclische Proton mit der kleinsten Verschiebung immerhin noch um 0.37 ppm.
Die ^{1}H-NMR - Spektren (Abb. 2 und 3) sprechen für (12) als Hauptprodukt mit folgender Zuordnung der Banden:



δ (ppm)	2.26	2.37	2.52	2.93	3.00	5.43
Aufspaltung	m	s	m	s	m	m
Zuordnung	5	1	6	7	2	4
Intregr.-verh.	2.07	2.93	2.06	5.95	2.25	1.00



δ(ppm)	2.63	2.94	2.99	3.36	3.91	5.66	8.88
Aufspaltung	m	s	d	m	m	m	s
Zuordnung	5	1	7	6	2	4	8
Integr.-verh.	2.03	3.20	6.10	2.00	1.96	1.00	2.00

Abb. 1: GC des Reaktionsgemisches der Reduktion.in Ether.
Säule c) , Inj.-Temp. 350°C, 190°C isotherm.

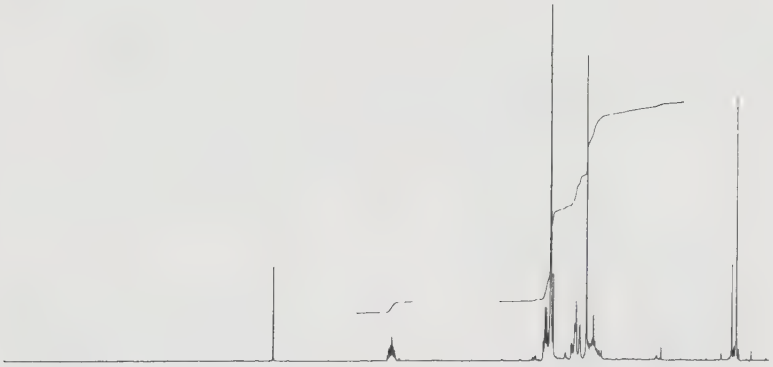


Abb. 2: ^{1}H-NMR von (12) in $CDCl_3$

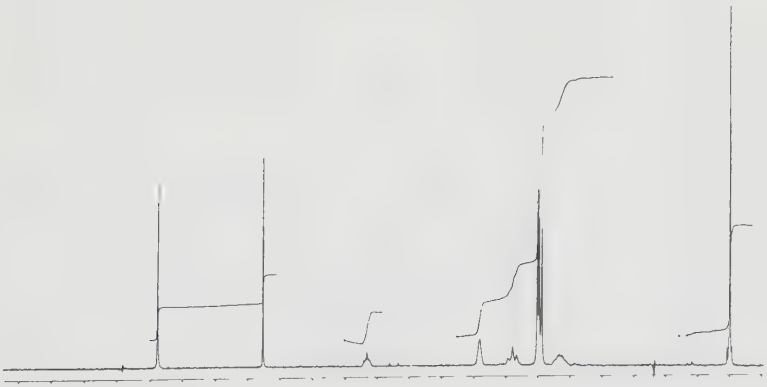
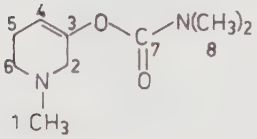


Abb. 3: ^{1}H-NMR von 1-Methyl-3-(N,N-Dimethylcarbamoyl)-1,2,5,6-Tetrahydropyridiniumpikrat in $CDCl_3$

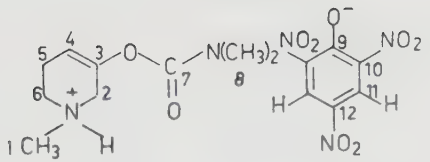
B) ^{13}C - NMR - Spektren.

Zuordnung der einzelnen Banden im ^{13}C - NMR - Spektrum des freien Amins ist durch Vergleich mit dem protonengekoppelten Spektrum möglich (Abb. 4) :



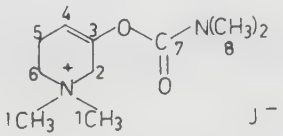
δ(ppm)	Zuordnung	Aufsp. im gek. Spektrum
23.48	5	T
35.80 35.94	8	Q
44.60	1	Q
50.71	6	T
54.54	2	T
110.52	4	D
145.28	3	S
154.11	7	S

Aus dem gekoppelten ^{13}C - NMR - Spektrum des Pikrats lassen sich durch Vergleich mit dem Literaturspektrum von Pikrinsäure die Pikratkohlenstoffatome eindeutig bestimmen [9] (Abb. 5 und 6):



δ (ppm)	Zuordnung	(ppm)	Zuordnung
162.08	9	111.06	4
153.63	7	52.56	2 oder 6
141.54	10	50.42	2 oder 6
139.72	12	42.35	1
128.35	3	36.51	8
126.46	11	19.99	5

Im ^{13}C -NMR -Spektrum des Methojodids treten folgende Banden auf (Abb. 7):



δ (ppm)	153.43	138.87	110.73	60.94	58.41	52.30	36.37	19.80
Zuordn.	7	3	4	2/6	6/2	1	8	5

Im Methoiodid treten für C-Atom 2 und 6 die zu erwartenden Tieffeldverschiebungen auf, im Pikrat erfahren diese C-Atome eine geringfügige Hochfeldverschiebung, wahrscheinlich hervorgerufen durch Anisotropieeffekte des Pikratanions.

Die angeführten ^{13}C - NMR - Spektren sind ebenfalls in Übereinstimmung mit der Zuordnung von Struktur (12) für das Hauptprodukt.

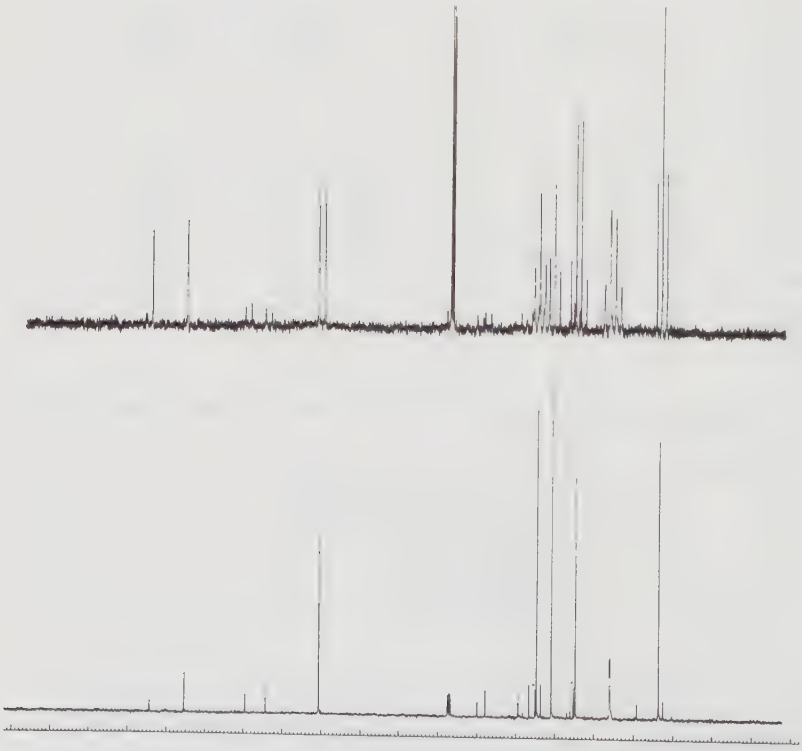


Abb. 4: ^{13}C-NMR von (12) in $CDCl_3$, breitbandentkoppelt und ^{1}H-gekoppelt

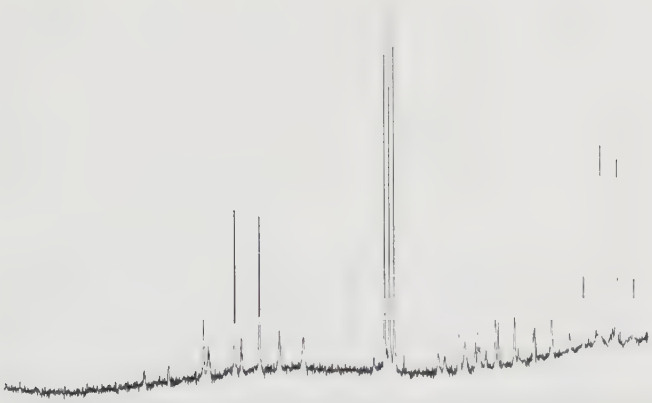


Abb. 5: ^{13}C-NMR von 1-Methyl-3-(N,N-Dimethylcarbamoyl)-1,2,5,6-Tetrahydropyridiniumpikrat in $CDCl_3$, ^{1}H-gekoppelt

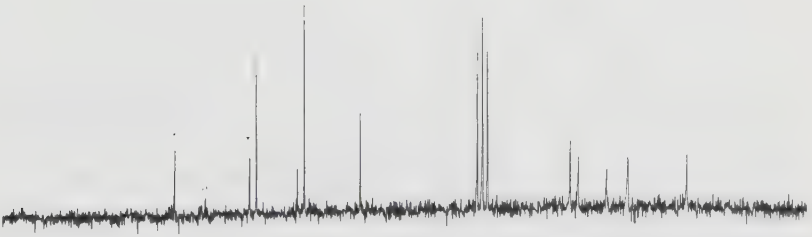


Abb. 6: ^{13}C-NMR von 1-Methyl-3-(N,N-Dimethylcarbamoyl)-1,2,5,6-Tetrahydropyridiniumpikrat in $CDCl_3$, breitbandentkoppelt

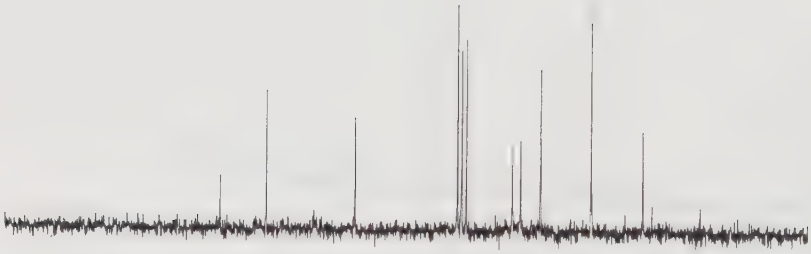


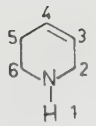
Abb. 7: ^{13}C-NMR von 1-Methyl-3-(N,N-Dimethylcarbamoyl)-1,2,5,6-Tetrahydropyridiniumjodid in $CDCl_3$, breitbandentkoppelt

C) Literaturvergleiche.

Verschiedene Autoren haben Reduktionsprodukte der Umsetzung von Pyridiniumsalzen mit Natriumborhydrid strukturell untersucht.[10-15] Sowohl bei den unsubstituierten[10,11] als auch bei den 3-substituierten Verbindungen[12,13] fanden sie als Hauptprodukt 1,2,5,6-Tetrahydropyridine.

Durch UV - Messungen und ^1H - NMR - Spektroskopie konnten 1,2,3,6 - und 1,2,4,6 -Tetrahydropyridine ausgeschlossen werden.[14,15]

Ein Vergleich der chemischen Verschiebungen der Protonen im 1,2,5,6 - Tetrahydropyridin nach[8] mit den Werten des hier vorliegenden Produktes bringt folgendes Ergebnis:



Proton	1	6	5	4	3	2
Literatur[8] (ppm)	1.63	2.95	2.07	5.72	5.77	3.33
gef. Werte für (12) (ppm)	--	2.37	2.26	5.43	--	3.00

Die beobachteten Unterschiede sind auf die Substituenteneinflüsse zurückzuführen.

2.2 NEBENPRODUKTE.

Um etwas über die Art der beiden Nebenprodukte zu erfahren, wurde die Produktverteilung unter verschiedenen Reaktionsbedingungen getestet. Einen Überblick über die gaschromatographisch bestimmte Ausbeuteverteilung gibt folgende Tabelle (H = Hauptprodukt, N_1 = Nebenprodukt 1 , N_2 = Nebenprodukt 2) :

Tabelle 1: Produktverteilung unter verschiedenen Reaktionsbedingungen.

Reaktionsbedingung	N_1+N_2/H	N_1/N_2	N_1/H	N_2/H
pH 7, Raumtemp.	0.29	1.17	0.16	0.13
pH 7, 0-5 °C	0.22	1.48	0.13	0.09
pH 7, 150 °C, 1 Std.	2.02	1.65	1.26	0.76
pH 14, Raumtemp.	0.12	0.16	0.02	0.11
pH 14, 0-5 °C	0.09	0	0	0.09
DMSO	0.03	0	0	0.03
EtOH, 80 °C, 1 Std.	0.03	0	0	0.03
Methanol	0.4	0.11	0.04	0.04

Aus diesen Experimenten läßt sich folgendes ablesen:

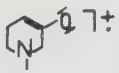
1) Mit steigenden pH - Werten nimmt der Anteil der beiden Nebenprodukte ab, wobei fast ausschließlich N_1 geringer wird und bei pH 14 in der Kälte ganz verschwindet. Der Anteil an N_2 scheint in erster Linie temperaturabhängig zu sein.

2) In nicht wässrigen Lösungsmitteln entsteht fast nur Hauptprodukt.

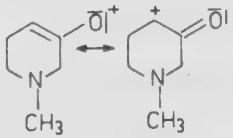
3) Beim Erhitzen des Reaktionsgemisches auf höhere Temperaturen entstehen weitere Nebenprodukte, die im GC bei kleinerer Retensionszeit erscheinen. Da dies im alkalischen und sauren Medium besonders stark auftritt, sollte es sich um Hydrolyseprodukte handeln.

Um aus den Massenspektren der Nebenprodukte etwas entnehmen zu können, ist es zunächst notwendig, das Massenspektrum des Hauptproduktes möglichst vollständig zu interpretieren (Abb. 8).

Massenspektrum von (12):

Masse	I_{rel} (%)	Zuordnung
184	8	M^+ - Peak
112	64	
94	16	
84	7	112 - CO
72	100	$O{=}C{-}N(CH_3)_2^+$

M^+ erscheint recht schwach, ist also nicht sonderlich stabil, wie es bei aliphatischen Aminen oft der Fall ist. m/e 112 ist sehr intensiv, wahrscheinlich wegen der Konjugationsmöglichkeit

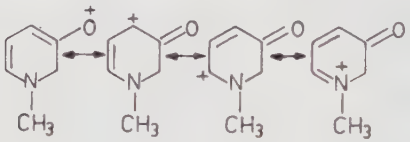


Ein sicheres Zeichen für die Anwesenheit der Carbamoylgruppe ist das Signal bei m/e 72, welches äußerst intensiv erscheint.

Im Massenspektrum des Nebenproduktes 2 (Abb. 8) tritt ebenfalls m/e 72 besonders stark auf, das Signal kann in dieser Stärke nur den Carbamoylrest repräsentieren, da sonst keine

sinnvolle Kombination mit der Masse 72 zu finden ist. Die Carbamoylgruppe muß also vorhanden sein. Daraus folgt, daß M^+ fehlt. $M^+ - 72$ fehlt ebenfalls, da im Bereich m/e 105 - 115 kein Signal auftritt.

Dafür erscheint m/e 94 sehr stark, welches beim Hauptprodukt relativ schwach war. m/e 94 kann entweder aus 112 - H_2O oder 110 - O entstanden sein. m/e 110 entspräche dem Dihydroprodukt, dann läge aber die Konjugationsmöglichkeit



vor. m/e 110 sollte dann so stabil sein, daß ein Signal auftritt. Außerdem wäre dann CO - Abspaltung zu erwarten und damit 110 - 28 = 82. Dies ist jedoch nicht der Fall, m/e 82 und 84 fehlen.

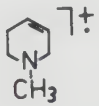
Sinnvollerweise muß es sich dann ebenfalls um ein Tetrahydroprodukt handeln, wobei m/e 112 so instabil ist, daß sofort Wasserabspaltung eintritt, woraus m/e 94 resultiert. Dies läßt sich so erklären, daß bei Tetrahydroprodukten mit einer stellungsisomeren Doppelbindung die Konjugationsmöglichkeit und damit Stabilisierung wegfällt.

Für die Lage der Doppelbindung gibt es zwei Möglichkeiten:

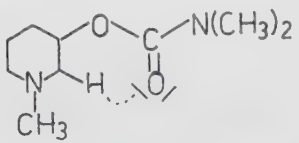
Entweder Struktur (13) oder Struktur (14).

In allen anderen Stellungen ist Konjugation möglich.

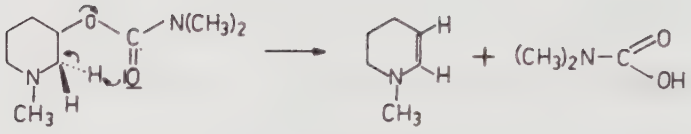
Massenspektrum von Nebenprodukt 2 (Abb. 8):

m/e	I_{rel} (%)	Zuordnung
96	5	
94	64	$M^+ - O{=}C{-}N(CH_3)_2^+ - H_2O$

Im Massenspektrum von Nebenprodukt 2 tritt m/e 72 viel schwächer auf als bei den beiden anderen Produkten. Wenn das Signal aber auch von der Carbamoylgruppe herrührt, ist auf den ersten Blick nicht einzusehen, warum so wenig intensiv.
Betrachtet man aber die sterischen Verhältnisse in einem Piperidinring mit Carbamoylgruppe in 3 - Stellung, erkennt man, daß eine H····O - Wechselwirkung zwischen der CO - Gruppe und einem Ring - H - Atom in 2 - Stellung möglich ist.



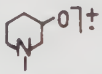
Damit kann eine Umlagerung vom Mc Lafferty - Typ über einen sechsgliedrigen Übergangszustand erfolgen:



97

Auf diese Weise läßt sich der intensive Peak bei m/e 97 sowie die schwache Intensität von m/e 72 erklären.

Massenspektrum von Nebenprodukt 1 (Abb. 8) :

m/e	I_{rel} (%)	Zuordnung
114	1.4	
97	100	
98	12	114 - O
96	60	114 - H_2O
82	26	97 - CH_3

Die Massenspektren lassen auf ein isomeres Tetrahydropyridinderivat ((13) oder (14)) für das Nebenprodukt 2 sowie ein Piperidinderivat für das Nebenprodukt 1 schließen.

Um NMR - Spektren aufnehmen zu können, mußten die Produkte voneinander getrennt werden. Destillation war nicht möglich, da hierbei Zersetzung der Amine unter Braunfärbung stattfand. Dünnschichtchromatographische Trennungsversuche blieben erfolglos, die Systeme waren aufgrund ihrer Ähnlichkeit auf diese Weise nicht trennbar. Der Versuch, die Pikrate durch Umkristallisieren zu

reinigen und voneinander zu trennen, lieferte zwar ein reines Hauptprodukt, die Nebenprodukte konnten jedoch nicht genügend aufkonzentriert werden.

Deshalb wurde ein anderer Weg eingeschlagen:

Das Gemisch der Reduktionsprodukte der Reaktion mit $NaBH_4$ in wässriger Lösung bei Raumtemperatur wurde isoliert und darauf einer alkalischen Hydrolyse unterworfen. Bei einer Temperatur von 120 ^{o}C zersetzte sich in erster Linie das Hauptprodukt , die beiden Nebenprodukte blieben weitgehend erhalten. Es entstanden mehrere Hydrolyseprodukte. Die Zusammensetzung des Gemisches wurde gaschromatographisch verfolgt.

Das fertige Hydrolysegemisch enthielt die beiden Nebenprodukte in nahezu gleicher Konzentration, das Hauptprodukt betrug etwa 10 % von jedem der Nebenprodukte.

Zur Abtrennung der Hydrolyseprodukte wurde das Reaktionsgemisch in 0.1 n NaOH aufgenommen und mit Tert.-Butylmethylether extrahiert. Dabei blieben die hydrolysierten Verbindungen in der wässrigen Phase zurück. Danach wurde der Ether abgezogen.

Vom zurückbleibenden Gemisch wurde ein ^{13}C - NMR - Spektrum aufgenommen. (Abb. 9)

Hier treten im Bereich 80 - 160 ppm vier Banden auf. Bei 155.5 ppm erscheinen zwei intensitätsschwache Signale, welche den C=O - Gruppen der beiden Nebenprodukte zuzuordnen sind.

Bei 110.7 ppm erscheint ein Signal, welches von einem olefinischen C-Atom des Hauptproduktes herrührt, wie durch Vergleich mit dem betreffenden Spektrum gezeigt werden kann.

Es bleiben also nur zwei Signale, welche im H - gekoppelten Spektrum in Dubletts aufspalten.

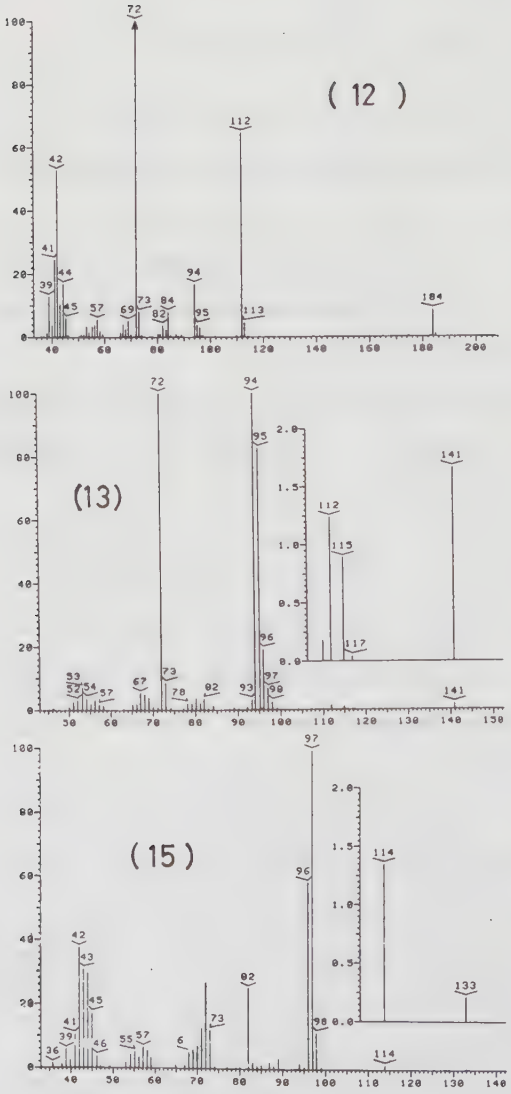


Abb. 8: MS der drei Reduktionsprodukte der Reduktion von (1) mit Natriumborhydrid.

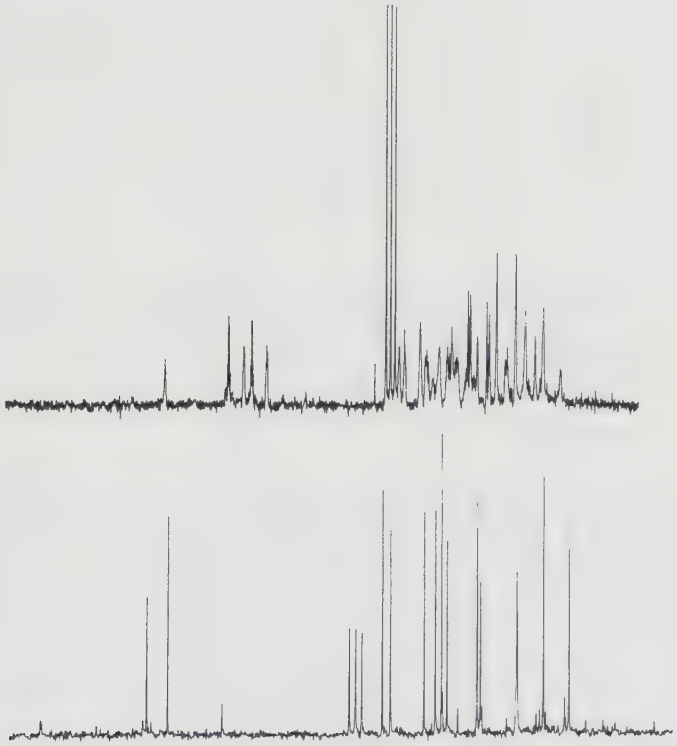


Abb. 9: ^{13}C-NMR der beiden Nebenprodukte in $CDCl_3$, ^{1}H-gekoppelt und breitbandentkoppelt

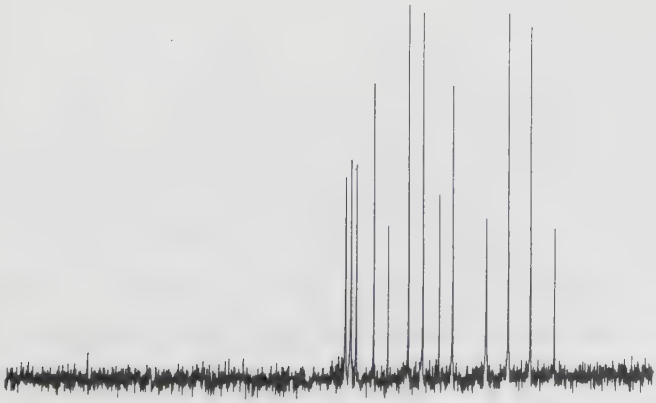
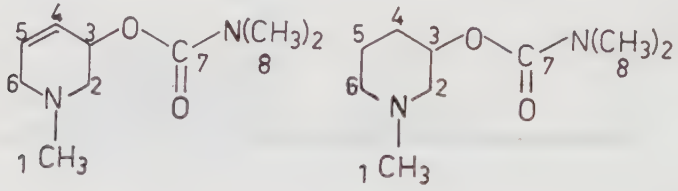


Abb. 10: ^{13}C-NMR von (15) in $CDCl_3$, breitbandentkoppelt

Es handelt sich also um zwei CH - Gruppen.

Daraus folgt unmittelbar, daß es sich bei den Nebenprodukten um eine Tetrahydroverbindung und um eine im Ring gesättigte Verbindung handelt. Weiterhin treten zwei Signale als Dubletts bei 68.12 und 70.17 ppm auf, welche von den C - Atomen in 3 - Stellung stammen:



Zum Beweis, daß Nebenprodukt 1 tatsächlich die völlig durchhydrierte Verbindung ist, wurde das Reaktionsgemisch einer katalyt. Hydrierung mit Palladium / Aktivkohle unterworfen. Das erhaltene Produkt wurde gaschromatogrphisch und massenspektroskopisch untersucht. Es stellte sich heraus, daß es in beiden Fällen mit Nebenprodukt 1 identisch ist.

Endgültigen Beweis brachte das ^{13}C - NMR - Spektrum:

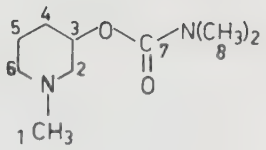
Hier traten im Bereich über 70 ppm keine Signale außer denen der C=O - Gruppe auf. (Abb. 10)

Durch Vergleich des Spektrums von Nebenprodukt 1 und dem Spektrum des Gemisches konnten in letzterem die Signale den beiden Verbindungen eindeutig zugeordnet werden. Dabei wurde zusätzlich das H - gekoppelte Spektrum zu Hilfe genommen.

Um eine Aussage über die Zuordnung der einzelnen C - Atome in den Molekülen zu treffen, wurden weiterhin Inkremente berechnet und mit den experimentellen Daten verglichen. Die

berechneten Werte setzen sich aus in [8] angegebenen Daten zusammen.

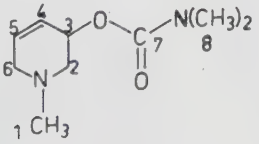
^{13}C - NMR von



(15)

(ppm)	Aufspaltung	Zuordnung	Inkrementwert
59.7	T	2	60.5
70.2	D	3	74.2
29.3	T	4	29.7
22.8	T	5	20.0
56.9	T	6	57.2
46.2	Q	1	47.7
36.0	Q	8	--
150.3	S	7	--

^{13}C - NMR von

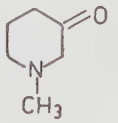


(13)

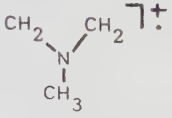
δ (ppm)	Aufspaltung	Zuordnung	Inkrementwert
55.3	T	2	55.0
68.1	D	3	74.0
129.8	D	4	127.6
124.5	D	5	118.6
53.8	T	6	54.2
45.4	Q	1	45.9
36.0	Q	8	--
150.3	S	7	--

Wie bereits oben erwähnt, traten bei der Hydrolyse des Reduktionsgemisches im GC zusätzliche Signale bei kleinerer Retentionszeit auf, welche als Hydrolyseprodukte interpretiert wurden.(Abb.**1**) Diese konnten durch GC/MS - Kopplung identifiziert werden:

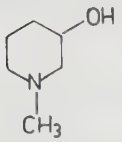
Signal 1 (Abb. 1)



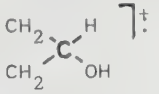
(16)

m/e	113	85	84	57
I_{rel} (%)	55	50	82	100
Zuordnung	M^+-Peak			

Signal 2 (Abb. 1)



(17)

m/e	115	97	58
I (%)	18	2	85
Zuordnung	M^+-Peak	M^+-H_2O	

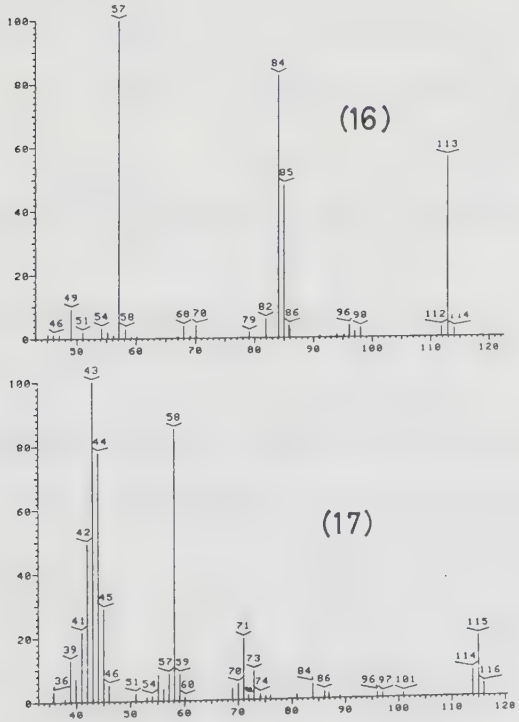
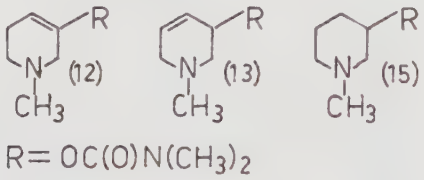


Abb. 11: MS von (16) und (17)

3. OPTIMIERUNG DER REAKTIONSBEDINGUNGEN.

Bei der Reduktion von Pyridostigmin durch Natriumborhydrid entstehen also die folgenden drei Produkte:

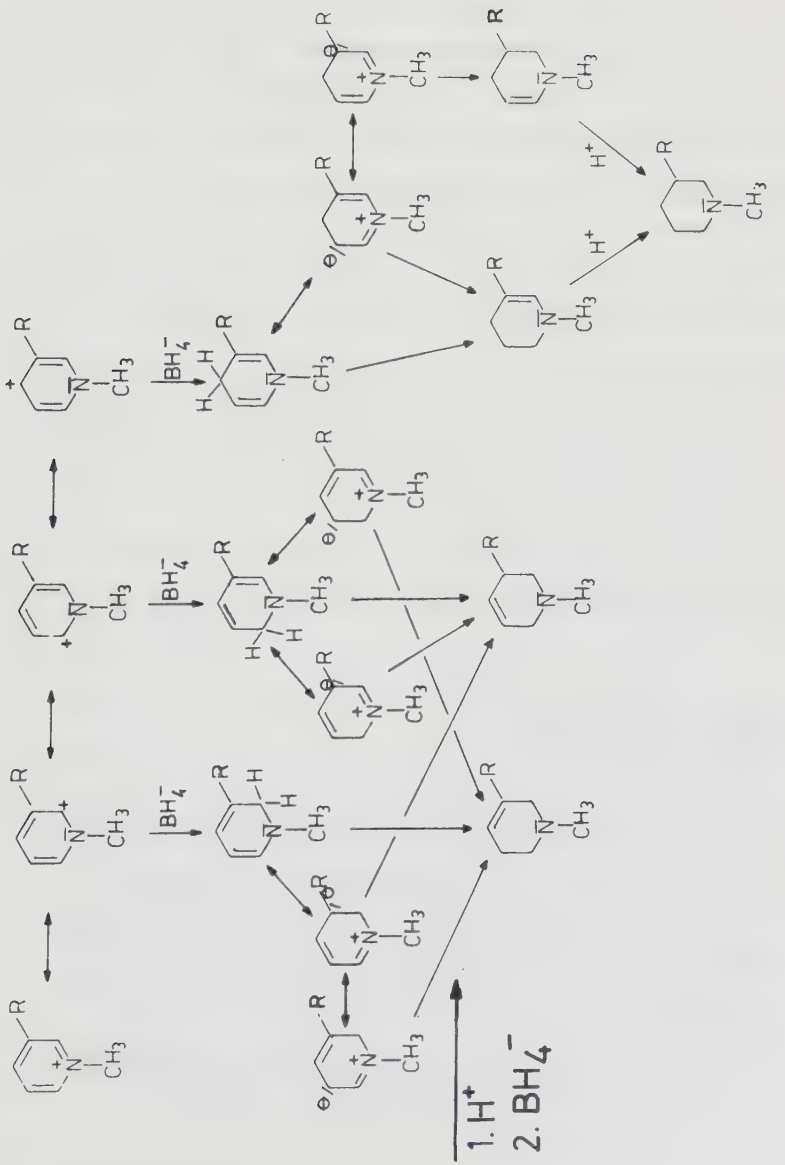


Da (13) und (15) bei pH 10 in wässriger Lösung bei Raumtemperatur immerhin zu 20 % auftreten, mußte versucht werden, durch Variation der Reaktionsbedingungen die Bildung der Nebenprodukte zurückzudrängen, sonst wäre eine Anwendung im analytischen Rahmen zwecklos.

Zum besseren Verständnis der Bildungsweise ist es zunächst sinnvoll, das Zustandekommen der drei Produkte mechanistisch zu erklären.

Nach [12] und [14] wird die Reaktion durch Angriff von $NaBH_4$ an den nucleophilen Positionen 2,4 und 6 des Pyridinringes eingeleitet. An der so entstandenen Enaminstruktur ist nun ein H^+ - Angriff am elektrophilen Zentrum möglich. Beim Angriff von $NaBH_4$ in 4 - Position erhält man vollständige Dehydrierung, da zwei Enaminstrukturen vorliegen.

Der Angriff in Position 2 muß bevorzugt sein, da daraus das Hauptprodukt resultiert.


1. H+
2. BH4−

3.1 PH - WERT DER WÄSSRIGEN LÖSUNG.

Um den Einfluß des pH - Wertes auf die Produktverteilung zu erkennen, wurde eine wässrige Lösung von Pyridostigmin mit einer Glaselektrode auf das entsprechende pH eingestellt und nach Reaktion mit $NaBH_4$ gaschromatographisch untersucht.
Mit sinkendem pH nahm der Anteil der Nebenprodukte zu. Während bei pH 14 nur 9 - 12 % entstanden, waren es bei pH 7 schon 22 - 29 %. Bezüglich des Reaktionsumsatzes konnte keine eindeutige Tendenz festgestellt werden, er schien unabhängig vom pH - Wert.
Allerdings entstanden im stark alkalischen Bereich in zunehmendem Maß weitere Produkte, welche durch GC/MS - Kopplung als Hydrolyseprodukte identifiziert werden konnten. In 5n NaOH bei 150° C war (16) die ausschließlich entstandene Verbindung. Es schien daher ratsam, nicht alkalischer als pH 11 - 12 zu arbeiten.

3.2 TEMPERATUR UND ZEIT.

Aus Tabelle 1 (S. 18) resultiert eine eindeutige Verringerung der Nebenprodukte in der Kälte. So traten bei 0 - 5° C und pH 14 ca. 9% auf, bei Raumtemperatur waren es unter sonst gleichen Bedingungen 12%. Derselbe Effekt wurde mit anderen pH - Werten erreicht.
Variation der Reaktionszeit brachte keine Veränderung der Produktverteilung und des Reaktionsumsatzes. 5 -10 Minuten erwiesen sich als ausreichend.

3.3 UMSETZUNG IN ORGANISCHEN LÖSUNGSMITTELN.

Wie in [1] beschrieben, konnte durch Zugabe von Alkoholen die Bildung von Nebenprodukten erheblich zurückgedrängt werden. Es lag daher der Versuch nahe, die Reaktion in nicht wässrigem Medium durchzuführen. Aus Gründen der Löslichkeit kamen nur organische Solventien in Frage. Dabei ergaben sich folgende Werte:

Tabelle 2: Produktverteilung bei Durchführung der Reaktion in org. Lösungsmitteln.

Lösungsmittel	Nebenprodukt 1	Nebenprodukt 2
Methanol	1%	4%
Ethanol	0	3%
DMSO	0	3%

Aus allen diesen Versuchen lassen sich folgende Schlüsse ziehen:

1) Weitgehend einheitliche Produktführung ist in wässrigem Medium unter alkalischen Bedingungen (pH 10-12) bei Temperaturen zwischen 0 und 5° C möglich. Die Nebenprodukte entstehen zu weniger als 10%. Stärker alkalische Bedingungen und höhere Temperaturen fördern die Hydrolyse.
2) In organischen Solventien läßt sich die Bildung von Nebenprodukten praktisch vollständig unterdrücken. Besonders geeignet scheinen Alkohole zu sein.

4. PROBENAUFARBEITUNG UND NACHWEIS VON PYRIDOSTIGMIN AUS BLUTSERUM.

Nach den oben beschriebenen Ergebnissen der Optimierungsversuche schien es sinnvoll, die Reduktion nicht direkt in Probenlösung, sondern in einem nichtwässrigen System durchzuführen.
Zwei Möglichkeiten boten sich hier an:

1) Gefriertrocknen des Serums und Aufnahme des Rückstands in Alkohol oder DMSO. Diese Prozedur wäre allerdings zeitraubend und für eine Routineanalyse nicht tragbar.
2) Zugabe eines lipophilen Anions und Extraktion als Ionenpaar in die organische Phase. Diese Methode beruht auf dem Effekt, daß org. Anionen mit großem, hydrophobem Rest leicht unter Mitnahme des Gegenions als Ionenpaar in die org. Phase übergehen.

Zahlreiche Veröffentlichungen berichten über die Anwendung dieser Methode. Als Anionen fanden vor allem Anthracen-2-Sulfonat[16], 2,4-Dinitro-o-Kresol, Dipikrylamin[17], Pikrinsäure[18] oder Kaliumtriiodid[5] Verwendung.

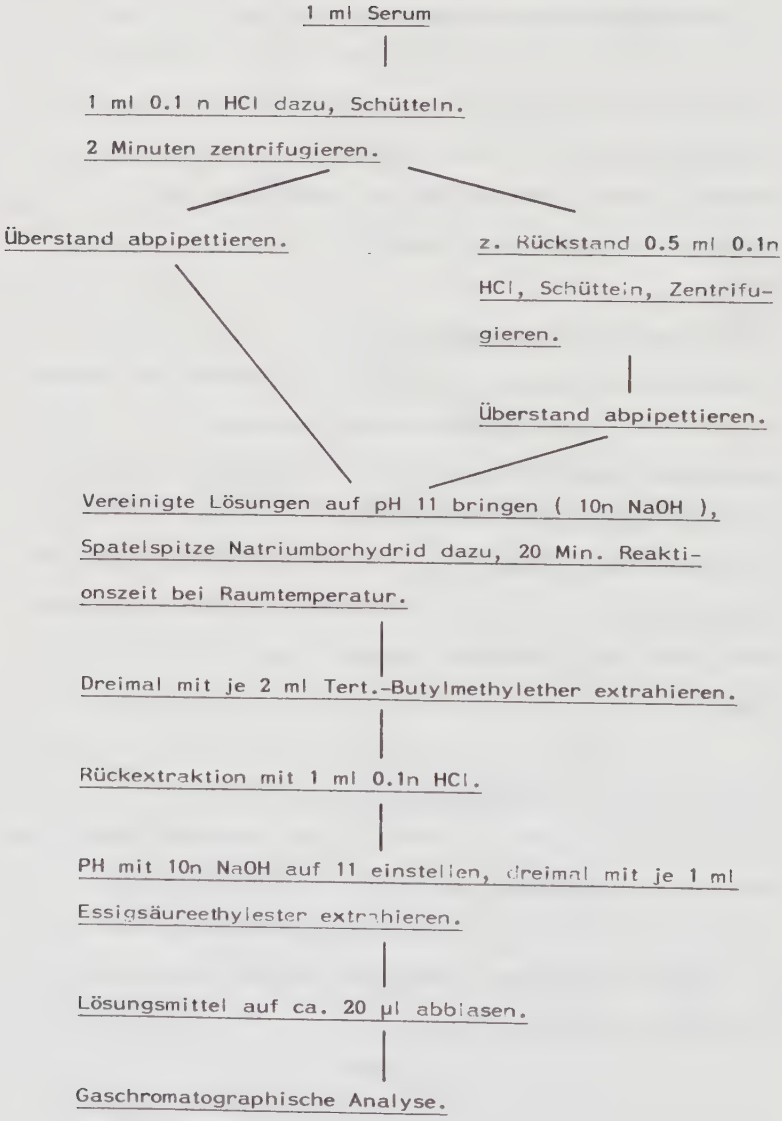
Einige Autoren berichten über den erfolgreichen Nachweis von (1) und Neostigmin (N,N,N-Trimethyl- (3-(N,N-Dimethyl)-carbamoyl)-aniliniumbromid) nach Ionenpaarextraktion mit ClO_4^-[2], Heptansulfonsäure[6] und Kaliumjodid-Glycinpuffer[3,4].

Versuche mit Pikrinsäure als Gegenion zeigten bald, daß (1) durch Extraktion mit Dichlormethan tatsächlich vollständig in die org. Phase überführbar ist. Das Serum wurde dazu lediglich mit wässriger Pikrinsäurelösung versetzt und mit der zehnfachen Menge Dichlormethan ausgeschüttelt.

Bei der Reduktion mit Natriumborhydrid zeigte sich jedoch bald der Nachteil dieses Verfahrens: Die mitgeführte Pikrinsäure war nicht mehr auf einfache Weise abtrennbar, sie störte aber im weiteren Analysengang erheblich, sodaß sich die Anwendung des Verfahrens im analytischen Rahmen als unmöglich erwies.
Versuche mit anderen Ionenpaarbildnern wurden nicht durchgeführt.
Es blieb demnach nur die Möglichkeit, die Reduktion direkt im Serum, also in wässriger Lösung durchzuführen und das Produkt zu extrahieren. Dazu mußte allerdings zuvor das im Serum enthaltene Protein ausgefällt und abgetrennt werden, da ansonsten Reaktion mit $NaBH_4$ und starke Schaumbildung auftrat. Die Fällung wurde durch Zugabe von 0.1 n HCl oder 60 %ige $HClO_4$ erreicht. Nach Zentrifugieren und Einstellen der Lösung auf pH 10 konnte dann $NaBH_4$ problemlos zugegeben und die Reduktion durchgeführt werden.

Es erwies sich als notwendig, das extrahierte Produkt mit 0.1 n HCl zurückzuextrahieren, da sonst zu viele störende Begleitkomponenten im Chromatogramm das gewünschte Signal überdeckten.

Das folgende Fließdiagramm zeigt eine Übersicht über den gesamten Aufarbeitungsgang.


1 ml Serum
1 ml 0.1 n HCl dazu, Schütteln.
2 Minuten zentrifugieren.
Überstand abpipettieren.
z. Rückstand 0.5 ml 0.1n HCl, Schütteln, Zentrifugieren.
Überstand abpipettieren.
Vereinigte Lösungen auf pH 11 bringen (10n NaOH), Spatelspitze Natriumborhydrid dazu, 20 Min. Reaktionszeit bei Raumtemperatur.
Dreimal mit je 2 ml Tert.-Butylmethylether extrahieren.
Rückextraktion mit 1 ml 0.1n HCl.
PH mit 10n NaOH auf 11 einstellen, dreimal mit je 1 ml Essigsäureethylester extrahieren.
Lösungsmittel auf ca. 20 µl abblasen.
Gaschromatographische Analyse.

Mit Hilfe eines Flammenionisationsdetektors (FID) konnte die Probenlösung in einer unpolaren Kapillarsäule OV 101 (Säule a) aufgetrennt und Pyridostigmin eindeutig durch Zumischmethoden und anhand der Retentionszeiten nachgewiesen werden.(Abb.12) Die Erfassungsgrenze bei Verwendung eines FID betrug 1 µg Pyridostigmin pro ml Blutserum. Die im Blut auftretende Konz. von 10 - 50 ng/ml sollte nach diesem Aufarbeitungsverfahren bei Verwendung eines PND erreichbar sein.
Wie in der Diplomarbeit [1)] beschrieben, wäre für quantitative Messungen als interner Standard das entsprechende N-Ethyl-Analoge des Pyridostigmin bei Verwendung einer polaren Kapillarsäule , z.B. Carbowax 20M (Säule c) geeignet. Quantitative Untersuchungen wurden jedoch im Rahmen dieser Arbeit nicht durchgeführt.

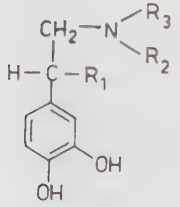
Abb. 12: GC der Aufarbeitung von 1µg (1) in 1 ml Serum. Säule a), Ini.-Temp. 300°C, 100 - 280°C, HR = 8°C/Min.

II. GASCHROMATOGRAPHISCHE ANALYSE VON INDOLAMINEN IM HARN.

1. PROBLEMSTELLUNG.

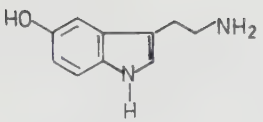
Die chemische Signalübertragung zwischen den Nervenzellen wird durch sogenannte Neurotransmittersubstanzen bewerkstelligt. Jedes Neuron produziert seine Transmittersubstanz selbst, sodaß die Neuronen in transmitterspezifische Zelltypen eingeteilt werden können. Die Neurotransmitter sind also gewissermaßen die Sprache der Neuronen, Signale werden nur an Nervenzellen mit gleicher Sprache, also gleicher Neurotransmittersubstanz übertragen.[19)]

Wichtige Neurotransmitter sind z.B. Acetylcholin (10), Serotonin und Catecholamine ((18) bis (20)).



Catecholamine

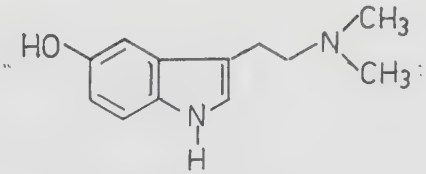
R_1	R_2	R_3	Name
OH	H	CH_3	Adrenalin (18)
OH	H	H	Noradrenalin (19)
H	H	H	Dopamin (20)



(21)

Serotonin

Eine Störung der Signalübertragung durch abnorm methylierte Metaboliten von Neurotransmittern aufgrund von Stoffwechselentgleisungen ist möglicherweise die Ursache für das Auftreten von Psychosen, zu denen auch die Schizophrenie gezählt wird.[20-22] Diese Vermutung kam durch die Beobachtung zustande, daß bekannte Rauschmittel wie LSD, Mescalin, aber auch DMT bei gesunden Personen schizophrenieartige Zustände wie Halluzinationen und Wahnvorstellungen hervorrufen.



Bufotenin (9)

Die Annahme einer endogenen Bildung ähnlicher Verbindungen im Körper psychotisch Erkrankter lag also nahe. Dies führte 1952 zur sog. "Transmethylierungshypothese" von Osmond und Smithies [23-25]. Weitere Unterstützung fand diese Hypothese 1960 durch die Arbeit von Pollin et al. [26]. Er berichtete, daß Methionin, ein

natürlicher Methyldonor, in Verbindung mit einem MAO -Inhibitor schizophrenieartige Zustände in drei von neun Fällen hervorriefe. Axelrod berichtete 1961 über die Entdeckung der N-Methyltransferase im Gehirn, welche die unspezifische Übertragung von Methylgruppen vom S-Adenosylmethionin auf Aminogruppen ermöglicht.[27,28)]

Während anfangs vor allem die Catecholamine als mögliche Schizotoxine im Blickpunkt des Interesses standen, erlangten in der Folgezeit die Indolamine dieselbe Bedeutung. Besondere Aufmerksamkeit gilt DMT und Bufotenin, da vor allem DMT als starkes Halluzinogen bekannt ist.[29-33)]

Seither wurden zahlreiche Nachweismethoden für Indolamine und Catecholamine aus Urin, Blut,Gewebe und Cerebrospinalflüssigkeit ausgearbeitet und veröffentlicht. Im folgenden wird ein Überblick über die bekannten Analysenverfahren für Indolamine gegeben.

Ein Großteil der Veröffentlichungen, vor allem vor der Zeit der Entwicklung von Kapillar-GC und HPLC, befaßt sich mit dünnschicht- und papierchromatographischen Nachweisverfahren. Als Detektionsmittel wurden meist Sprühreagenzien verwendet.

Probe	Verbindungen	Verfahren	Ergebnis	Lit.
Urin	(21)	Papierchr.,Bioassay	10-100 ng/ml bei Tieren	34)
Urin	(9)	Papierchr.,Bioassay	positiv	35)
Urin	(2),(9),(21)	Ionentauscher,Papierchr., Ehrlichreagenz	45-120 ng/l (21), bei Gesunden (9) negativ	36)
Urin	(9)	Papierchr.,Dimethylamino-benzaldehyd	bei 25 von 26 Patienten positiv	37)
Urin	(2),(7),(9)	Papierchr.,UV,MS,Ehrlichre-agenz	(7) + (9) negativ	38)
Urin	(9)	DC,DMCA-Reagenz	Erf.-Grenze 1ng/l. Bei 21 Patienten negativ	39)
Hirn	(21)	Ionentauscher,Fluorimetrie	500 ng/g im Mäusehirn	40)
Urin Blut	(9)	DC,Fluoreszenz	65ng/l bei 50 Kontroll-personen. 9 von 50 1-27 ng/ml Blut	41) 42)

Urin	(9)	Papierchr., Ehrlichreagenz	bei 22 Patienten negativ	43)
Urin	(7),(8),(9)	Papierchr., DC, DMCA-Reagenz	positiv für alle Verb. bei Verabreichung eines MAO-inhibitors	44)
Urin	(7),(9)	DC, DMCA-Reagenz	bei (9) 2-5 µg/24h mit MAO unter 1 µg/24h ohne MAO	45) 46)
Urin	(7),(9)	DC, Papierchr., Ehrlichreagenz	bei (7) 3 von 15 positiv, bei (9) 1 von 15 positiv	47)
Urin	(7),(8)	Cellulose-DC, Fluoreszenz	Erf.-Grenze 1-2 µg/l, bei 2 Patienten (9) positiv	48) 49)
Urin	(7),(8),(9)	DC, DMCA-Reagenz, Ehrlich-reagenz	(7) + (9) bei Patienten ohne Medikamente	50)
Urin	(9)	DC, DMCA-Reagenz	3-5 µg/24h, bei Gesunden auch mit MAO negativ	51)
Blut	Indolamine	DC, Formaldehyd/NH_3, DMCA	nur (21) gefunden	52)
Urin	(2)	DC, UV, MS, Dansylderivate	100 µg/24h bei18 Personen	53)

In jüngster Zeit richteten sich die Analysenmethoden mehr auf GC und HPLC aus, da hier aufgrund besserer Trennleistung zuverlässigere Ergebnisse zu erwarten sind.

Probe	Verb.	Verfahren	Ergebnis	Lit.
Urin	(7),(9)	GC,FID	2-5ng/24h mit MAO, unter 1µg/24h ohne MAO bei (9)	45) 46)
Urin	(9)	GC,MS	positiv bei Patienten	54)
Urin Blut	(7)	GC,MS	(7) positiv, aber nicht erhöht bei Patienten	55)
Gewebe	(3),(7)	GC,MS	800pmol/mg (3) bei SAM Einsatz, ohne 2pmol/mg (7) negativ	56)
Blut	(7)	GC,MS	(7) im pg-Bereich.Kein Unterschied Pat./Gesunde	57)
Urin	(3),(7)	GC,MS,PND	386ng/24h (7),856ng/24h (3) bei 19 Gesunden	58)
Gewebe	(7)	GC,ECD	4.6ng/g im ZNS endogen	59)
CBS-Fl.	(3),(6), (7),(8)	GC,ECD	kein Unterschied Pat./ Gesunde	60)
Urin	(3),(7)	GC,PND	(7) erhöht bei best. Psych.,sonst 500ng/l	61) 62)

Urin	(7),(9)	GC,MS	(7) 80-100ng/g Kreatinin (9) 930ng/g Kreatinin	63)
Blut	(7),(8)	GC,MS	10-120pg/ml(7) bei Pat.	64)
CBS-Fl.	(7)	GC,MS	0.1-100ng/ml bei Ges. und Patienten	65)
Hirn	(5)	GC,MS	100-600pmol/g (Tiere)	66) 67)
Blut	(5)	GC,MS	Bestandteil des ZNS	68)
Hirn	(2),(21)	GC,MS	4.16ng/g (2), 530ng/g (21) bei Ratten endogen	69)
Hirn	(21)	HPLC,elektrochem. D.	690ng/g, mit MAO Anstieg um 200%	70) 71)

Wie aus den Tabellen ersichtlich ist, konzentrierte sich das Interesse vor allem auf Bufotenin und DMT. Die Ergebnisse sind jedoch durchaus widersprüchlich.

Gegen die Transmethylierungshypothese kann eingewendet werden, daß die postulierten Verbindungen auch bei gesunden Kontrollpersonen gefunden wurden und zum Teil ernährungsabhängig sind.

Für die Hypothese sprechen aber folgende Befunde:

1) Bei Verabreichung eines MAO-Inhibitors wurden sowohl (7) als auch (9) und andere Indolamine im Urin nachgewiesen.[44)]
Die Verbindungen wurden aber bei Gesunden auch nicht nach Einnahme eines MAO-Inhibitors gefunden.[51)] Im Gehirn wurde ein Anstieg von Serotonin um 200% nach Verabreichung eines MAO-Inhibitors registriert.[70,71)]

2) Einige Autoren stellten tatsächlich eine Konzentrationserhöhung von (7) bei manchen Arten von Psychosen fest.[61,62]

Auffallend ist der meist positive Nachweis von DMT und Bufotenin bei Anwendung von DC und Papierchromatographie in Verbindung mit Sprühreagenzien oder Fluoreszenzdetektion. Hier wurden sogar Metabolitenkonzentrationen im Mikrogrammbereich festgestellt. Dazu muß allerdings der Einwand gebracht werden, daß es sich bei diesen Verfahren um halbquantitative Methoden handelt, deren Trennleistung hinter GC und HPLC doch erheblich zurücksteht, auch wenn durch Einwirkung von Sprühreagenzien eine spezifische Detektion angestrebt wurde.[72-77]
Die Substanzcharakterisierung ist daher oft zweifelhaft, da die Identifizierung nur über die R_F-Werte erfolgt. Quantitative Aussagen sind schwierig. Gerade dies wäre aber wichtig, da alle als Schizotoxine postulierten Verbindungen auch bei Gesunden gefunden wurden. Diesen Methoden ist daher mit Mißtrauen zu begegnen.
Zuverlässigere Ergebnissne lassen GC und HPLC erwarten. Durch die hohe Trennleistung in Verbindung mit empfindlichen Detektoren wie ECD, PND, MS, UV - und elektrochemischem Detektor sind klare Substanztrennungen und dadurch quantitative Aussagen bis in niedrigste Bereiche möglich. Besonders MS-Detektion durch "Single Ion Monitoring" sollte einen spezifischen Nachweis gestatten,[78-85] obwohl es natürlich möglich ist, daß verschiedene Moleküle gleiche Ionen bilden.
Doch auch hier gab es widersprüchliche Ergebnisse.
Diese Tatsache ist eigentlich nur durch unzureichende Aufarbei-

tungstechniken des Urins zu erklären. So wurde in vielen Fällen Aceton verwendet, welches mit primären Aminen Schiffsche Basen bilden kann, oder Boratpuffer, die mit OH-Gruppen zu Estern kondensieren können.
Ein kritischer Punkt ist die meist durchgeführte Derivatisierung des Extraktes, welche zu fehlerhaften Resultaten führen kann. In keiner hier erwähnten Veröffentlichung wurde jedoch über systematische Untersuchungen der Derivatisierungsmethoden und der resultierenden Produktverteilung berichtet.

Die für die Zielsetzung dieser Arbeit relevanten Veröffentlichungen sollen an dieser Stelle kurz skizziert werden.
1) H. Rosengarten et al.[44], H. Tanimukai [47] trennten die Aminfraktion des Urins über einen Dowex 50 WX 2 Kationentauscher ab, die aromatische Basenfraktion wurde nach Waschen mit Ammoniumhydroxidlösung eluiert. Der getrocknete Rückstand wurde in Ethanol aufgenommen und papier-, bzw. dünnschichtchromatographisch weiter aufgetrennt, anschließend mit Dimethylaminobenzaldehyd bzw. DMCA-Reagenz sichtbar gemacht. Als Erfassungsgrenze wird 1 µg/l angegeben. In 3 von 15 Fällen wurde DMT nachgewiesen, in 1 Fall Bufotenin.
2) H. Tanimukai et al.[46] verwendete dieselbe Methode wie 1), die Extrakte wurden jedoch auch gaschromatographisch nach Derivatisieren mit HMDS mit FID untersucht. Erfassungsgrenze war 1 µg/24h Urin.
3) M.C.H. Oon und R. Rodnight[61] extrahierten 24h Urin mit Toluol

bei pH 11. Der Rückstand der Extraktion wurde präp. DC unterworfen. Nach Eluieren mit Methanol wurde mit TFAA in Heptan derivatisiert. NMT und DMT wurden im GC mit PND und massenspektroskopisch nachgewiesen. Nachweisgrenze war 30 ng/l Urin.
4) M. Räisänen und J. Käirkäinen[63] trennten Indolamine in 150 ml Urin mit XAD-Harz bei pH 11 ab. Elution erfolgte mit 20ml Essigester. Nach weiterer Auftrennung durch präp. DC wurde mit BSTFA derivatisiert. Der Nachweis erfolgte gaschromatographisch mit MS - Kopplung und Single-Ion-Detektion.
5) R.W. Walker et al. [64] extrahierten 10 ml Blut mit Chloroform bei pH 8-9. Nach Rückextraktion mit HCl und Einstellen des pH - Wertes auf 9 - 10 wurde nochmals mit Chloroform extrahiert und der abgeblasene Rückstand mit BSTFA derivatisiert. Der Nachweis erfolgte mit Single-Ion Monitoring.

Trotz dieser zahlreichen Analysenverfahren ist eine zuverlässige und reproduzierbare quantitative Methode zum Nachweis von Catecholaminen und Indolaminen aus biologischen Flüssigkeiten nach wie vor wünschenswert. Zwei grundsätzlich verschiedene Vorgehensweisen sind dabei denkbar:
1) Bei den sog. "Screeningmethoden" werden möglichst viele Komponenten der Basenfraktion aus dem Harn isoliert, nach weiterer Auftrennung in einzelne Gruppen wird versucht, möglichst viele Verbindungen zu identifizieren.
2) Eine begrenzte Gruppe von chemisch verwandten Aminen wird isoliert und nach gezielter Vortrennung und Derivatisierung nachgewiesen.

Die Screeningmethode hat zwar den Vorteil, daß eine große Gruppe von Verbindungen erfaßt wird, sie besitzt jedoch einige gravierende Nachteile:

Da viele Substanzen mit chemisch oft unterschiedlichen Eigenschaften gleichzeitig erfaßt werden, ist eine selektive Abtrennung von Verunreinigungen sowie eine substanzspezifische Derivatisierung zu eindeutigen Produkten unmöglich. Dies ist aber möglich, wenn man sich auf wenige ähnliche Verbindungen konzentriert. Letzteres erscheint daher sinnvoller.

Die vorliegende Arbeit hat das Ziel, durch systematische Untersuchungen der Urinaufarbeitungsmöglichkeiten und des Derivatisierungsverhaltens mit verschiedenen Reagenzien die Grundlagen für einen eindeutigen quantitativen Nachweis von möglichen Schizotoxinen zu schaffen. Aus dieser Gruppe wurden die Indolamine herausgegriffen, wobei das Hauptinteresse auf denjenigen ohne Hydroxigruppe lag.

2. DERIVATISIERUNGSVERSUCHE MIT TRIFLUORACETYLIERUNGS-REAGENZIEN.

2.1 ALLGEMEINE BEMERKUNGEN.

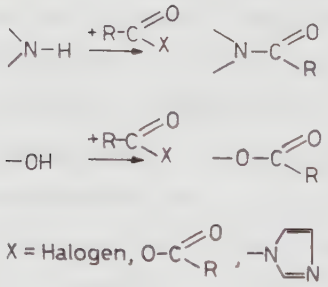
Wie Alkohole und Phenole gehören Amine als polare Substanzen zu den Verbindungsklassen, welche der gaschromatographischen Analyse nicht ohne weiteres zugänglich sind.
Polare Gruppen wie OH und NH setzen die Flüchtigkeit von Verbindungen oft erheblich herab. Dies beruht auf erhöhter Wechselwirkung der Moleküle untereinander als Folge von Wasserstoffbrücken. Derselbe Effekt bewirkt vor allem bei unpolaren stationären Phasen unsymmetrische Banden, sog. "Tailing". Im Extremfall erscheinen die Signale solcher Verbindungen nur noch als breiter, flacher Berg. Damit ist im Spurenbereich ein Erkennen des Signals und dessen quantitative Auswertung unmöglich.[86)]
Aus diesem Grund wird der gaschromatographischen Analyse ein Derivatisierungsschritt vorangestellt. Dies soll bewirken, daß die Verbindung unpolarer und flüchtiger wird und damit die gaschromatographischen Eigenschaften besser werden.
Die dazu verwendeten Derivatisierungsreagenzien müssen einige Bedingungen erfüllen:

1) Das Reagenz soll quantitativ und einheitlich mit der Substanz reagieren, d.h., es soll ein Produkt entstehen.
2) Die Reaktion soll möglichst in einem Schritt und unter reproduzierbaren Bedingungen verlaufen. Langwierige Aufarbeitungs-

prozeduren sind für Routineanalysen nicht durchführbar und zu vermeiden.

3) Das Reagenz sollte leicht flüchtig sein, da es in großem Überschuß eingesetzt wird und vor der Analyse entfernt werden muß.

Die weitaus größte Anwendung zur Derivatisierung von Amino- und Hydroxigruppen finden Reaktionen, bei denen aus dem Amin bzw. dem Alkohol ein Säureamid bzw. ein Ester gebildet wird:



So wird beispielsweise der Indolstickstoff in hohen Ausbeuten durch Säurechloride und Säureanhydride acetyliert[87,88]. Zahlreiche Beispiele für die analytische Anwendung sind in [89] zu finden.

Erheblich größere Bedeutung als einfache Acetylierungsreaktionen besitzen jedoch die Trifluoracetylierungsreagenzien. Deren Vorteile sind in folgenden Eigenschaften begründet:

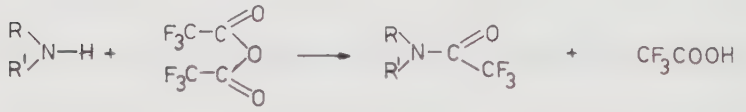
a) Sie sind leichter flüchtig als die entsprechenden unfluorierten Verbindungen, damit sind Reagenzüberschüsse auf einfachere Weise entfernbar.

b) Aufgrund der elektronenziehenden Wirkung der CF_3 - Gruppen sind diese Reagenzien reaktiver.
c) Bei Verwendung eines ECD erhält man eine um ein vielfaches niedrigere Nachweisgrenze, da der ECD auf elektronegative Elemente , insbesondere Fluor, spezifisch anspricht und eine äußerst hohe Empfindlichkeit besitzt.

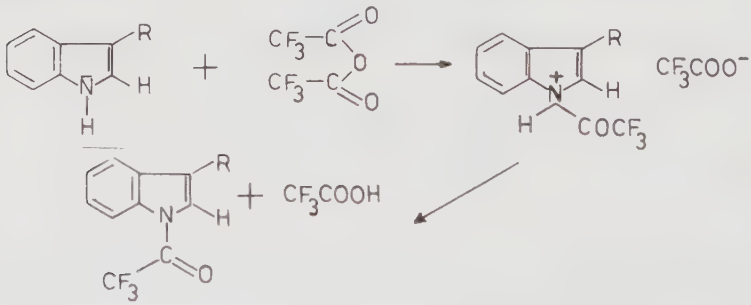
Im Rahmen dieser Arbeit wurden einige perfluorierte Verbindungen im Hinblick auf ihre analytische Anwendbarkeit zur Derivatisierung von Indolaminen untersucht. Besonderes Augenmerk wurde auf die Produktverteilung sowie die eindeutige Ermittlung der Struktur der Reaktionsprodukte gerichtet.

2.2 DERIVATISIERUNG MIT TRIFLUORESSIGSÄUREANHYDRID (TFAA).

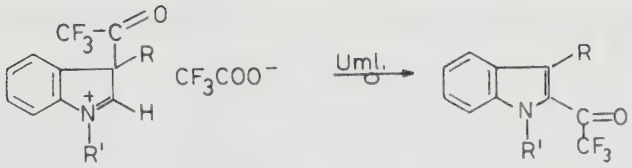
TFAA ist ein äußerst reaktives Acetylierungsmittel. Es reagiert mit primären und sekundären Aminen unter Bildung des entsprechenden Trifluoracetylderivates sowie Trifluoressigsäure (TFA).



Untersuchungen von Cipiciani und Clementi [90-92] zufolge verläuft die Trifluoracetylierungsreaktion nach folgendem Mechanismus :



Ist die 1 - Position besetzt, erfolgt Angriff in 3 - Stellung, danach erfolgt eine Umlagerung, falls die 3 - Stellung substituiert ist:



Bei unsubstituiertem Indolstickstoff erfolgt jedoch bevorzugt Angriff an Position 1.

TFAA ist eines der am meisten verwendeten Trifluoracetylierungsreagenzien.[93-97)]

M.C.H. Oon und R. Rodnight berichten über den gaschromatographischen Nachweis von DMT und NMT nach Derivatisierung mit TFAA (s.S. 46).[61)] Sie fanden eine Nachweisgrenze von30ng/l Urin bei Verwendung eines PND.

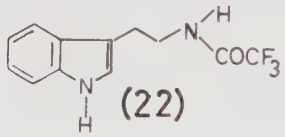
Dies sowie das Verhalten anderer Indolamine mit TFAA sollte deshalb näher untersucht werden.

Da die meisten Indolamine mehrere acetylierbare Stellen im Molekül aufweisen, waren von vornherein mehrere Reaktionsprodukte zu erwarten. Es mußte deshalb durch geeignete Wahl der Reaktionsbedingungen versucht werden, einheitliche Produkte zu erhalten.

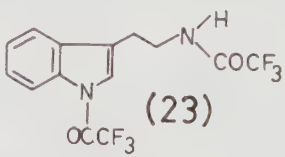
Die Umsetzungen wurden außer bei den präparativen Ansätzen zur Durchführung der spektrokopischen Messungen und zur Ermittlung der physikalischen Konstanten in sog. "Reaction Vials" mit teflonbeschichteter verschraubbarer Kappe unter Verwendung eines Heizblocks durchgeführt. Dabei wurde jeweils von etwa 1 mg Substanz ausgegangen, TFAA wurde in mindestens zehnfachem

Überschuß eingesetzt. Nach Beendigung der Reaktion unter den gegebenen Bedingungen wurden TFAA und, falls zugesetzt, das Lösungsmittel vollständig mit Stickstoff abgeblasen, der Rückstand in 100 µl Dichlormethan aufgenommen und eingespritzt.

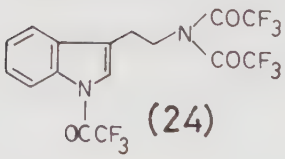
Beim Tryptamin entstanden entsprechend der Zahl der NH - Bindungen drei Acetylierungsprodukte. Diese konnten durch MS und NMR eindeutig charakterisiert werden.



(22)



(23)



(24)

Wie zu erwarten, bildete sich zunächst das Monoacetylierungsprodukt (22) mit der $COCF_3$-Gruppe am aliphatischen Seitenkettenstickstoff, erst dann wurde der Indolstickstoff trifluoracetyliert. Bei längeren Reaktionszeiten und zu hohen Temperaturen traten immer zwei oder gar alle drei Produkte auf. Unter geeigneten Bedingungen konnte aber einheitliche Reaktionsführung erreicht werden:

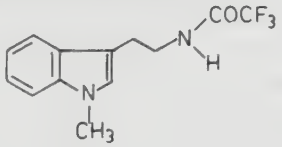
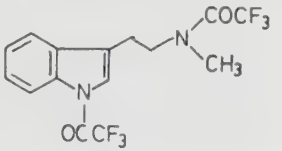
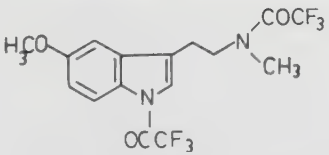
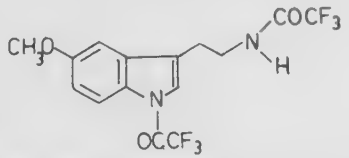
Bei Raumtemperatur und 30 Minuten Reaktionszeit entstand (22) zu 96 %. Wurde längere Zeit bei Raumtemperatur umgesetzt, entstanden (23) und (24) in etwa gleicher Menge.

Fast ausschließlich (23) entstand bei 60° C und achtminütiger

Reaktionszeit. Temperaturen um 60° C erwiesen sich überhaupt als am geeignetsten.

Eine weitere Verbesserung brachte die Zugabe von Dichlormethan als Lösungsmittel. Bei 60° C und 10 Minuten entstand hier ausschließlich (23). Andere Lösungsmittel wie THF und Acetonitril brachten nicht dieselben Erfolge.

Unter den angegebenen Bedingungen ergaben die folgenden Verbindungen ebenfalls einheitliche Derivate:

Ausgangsverbindung	Derivat	
(4)		(25)
(3)		(26)
(6)		(27)
(5)		(28)

Die Derivate konnten spektroskopisch eindeutig charakterisiert werden.

Da bei (4) die Position 1 von vornherein besetzt ist, sollte nach den auf S. 52 angestellten mechanistischen Überlegungen auch ein Derivatisierungsprodukt mit $COCF_3$-Gruppe in 2-Stellung auftreten. Dies war unter radikaleren Bedingungen (100°C, 1Std.) tatsächlich der Fall:

Neben (25) und dem am Seitenkettenstickstoff zweifach acetylierten Derivat kam im GC/MS das Signal einer weiteren Verbindung, welche in etwa gleicher Menge wie (25) entstanden war.

Aus dem MS folgte, daß es sich um ein zweifach acetyliertes Produkt handeln muß, dessen eine $COCF_3$-Gruppe am Indolring sitzt. (Abb. 29).

Bei der Umsetzung von DMT mit TFAA erschienen im GC keine definierbaren Signale, offenbar verlief hier die Derivatisierung nicht wunschgemäß. Da die Möglichkeit einer Salzbildung mit der in TFAA immer vorhandenen und bei der Reaktion zusätzlich entstehenden Trifluoressigsäure möglich erschien, wurde die Reaktion in Gegenwart von Hilfsbasen zum Abfangen der Säure durchgeführt. Sowohl mit 1,4-Diazabicyclo(2.2.2)-oktan als auch mit Triethylamin ließ sich kein Unterschied feststellen, es konnte kein DMT - Derivat nachgewiesen werden.

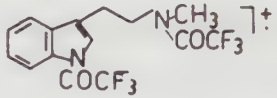
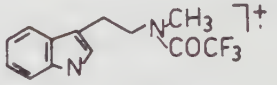
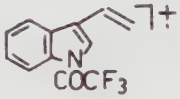
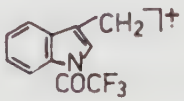
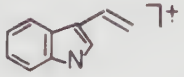
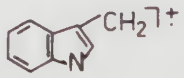
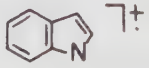
Dieser Umstand veranlaßte zu der Annahme, daß am Seitenkettenstickstoff eine Reaktion eintritt, welche zur irreversiblen Salzbildung führt.

Zum Beweis dieser Hypothese wurden DMT sowie N,N-Dimethylphenetylamin als entsprechende Modellverbindung in präparativen Ansätzen mit TFAA umgesetzt.

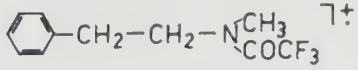
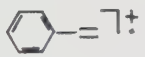
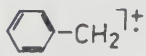
Bei den folgenden spektroskopischen Untersuchungen zeigte sich, daß keine Protonierung, sondern eine Trifluoracetylierung am Seitenkettenstickstoff und damit eine Quaternisierung des tertiären Amins stattfindet.

In den Massenspektren traten als größte Massenzahlen m/e 366 und m/e 231 auf. Dies entspricht einer $N(CH_3)COCF_3$-Gruppierung am Seitenkettenstickstoff, welche durch eine Abspaltung von Trifluoressigsäuremethylester zustandekommen kann. Erhärtet wird die Annahme durch das Auftreten der Mc Lafferty Umlagerung, bei der die Bruchstücke m/e 239 und m/e 104 entstehen.

MS von DMT + TFAA:

m/e	I (%)	Zuordnung
366	85	
269	14	
239	15	
226	17	
142	18	
129	52	
115	52	
69	100	CF_3^+
58	100	$CH_2\text{-}N(CH_3)_2^+$

MS von N,N-Dimethylphenetylamin + TFAA:

m/e	I (%)	Zuordnung
231	9	
140	69	$C_2H_5N(CH_3)COCF_3^+$
104	100	
91	21	

Das zur Kontrolle aufgenommene Massenspektrum von N,N-Dimethylphenetylammoniumtrifluoracetat, welches durch Umsetzung von N,N-Dimethylphenetylamin mit TFA in Ether dargestellt wurde, zeigt keinerlei Ähnlichkeit mit obigem Spektrum.

Bei den IR-Spektren in KBr dienen die CO-Valenzschwingungen als charakteristische Information. Hier sind im Fall von DMT zwei Banden in diesem Bereich unterscheidbar, nämlich bei 1728 cm^{-1} und 1675 cm^{-1}. Bei N,N-Dimethylphenetylamin taucht nur ein Signal bei 1678 cm^{-1} auf. Es ist in beiden Fällen nicht zu erkennen, ob eine Bande verdeckt ist.

Auch hier unterscheiden sich die Spektren eindeutig von den Trifluoracetaten der freien Basen. Neben einem starken C=O-Signal

bei 1670 cm^{-1} erscheint hier eine weitere intensive Bande bei 1780 cm^{-1}, welche in den beiden anderen IR-Spektren fehlt.

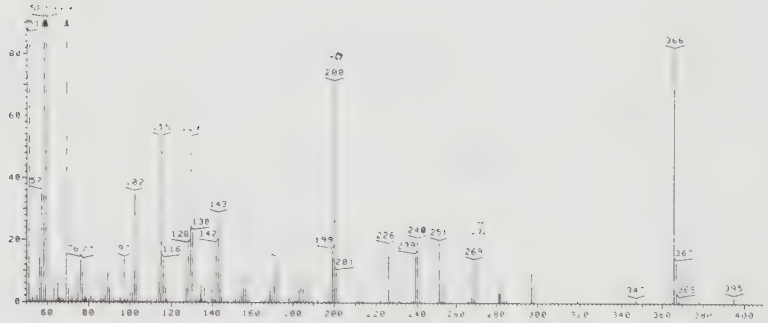


Abb. 13: MS der Umsetzung von DMT mit TFAA

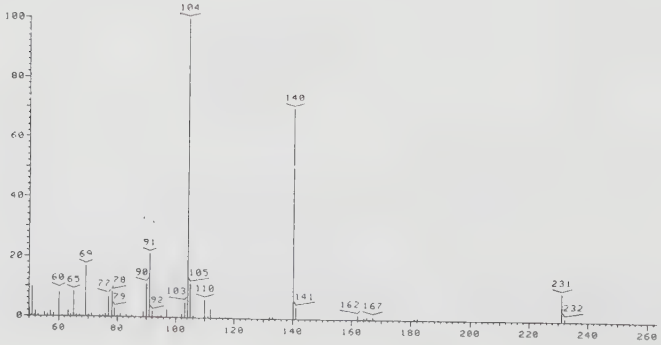


Abb. 14: MS der Umsetzung von N,N-Dimethylphenetylamin mit TFAA

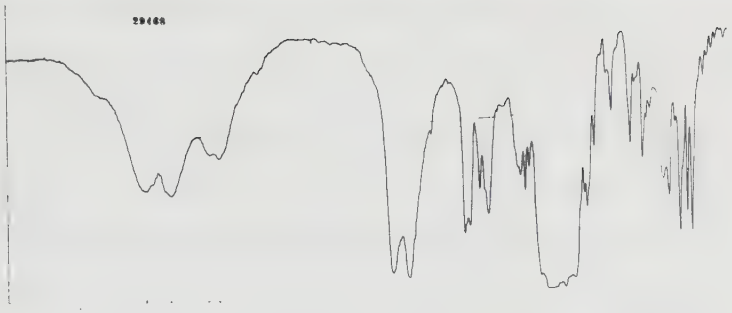


Abb. 15: IR der Ums. DMT + TFAA

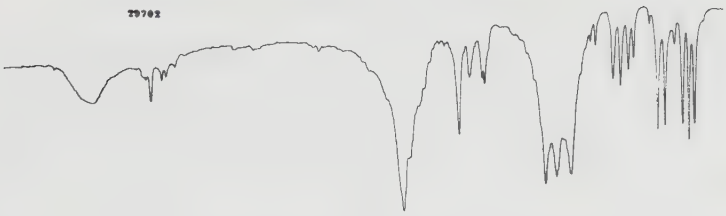


Abb. 16: IR der Ums. N,N-Dimethylphenetylamin + TFAA

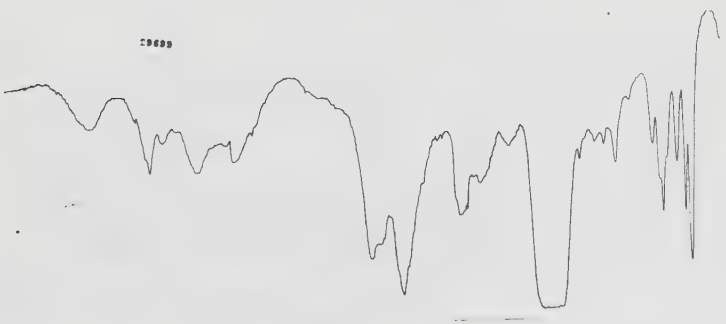
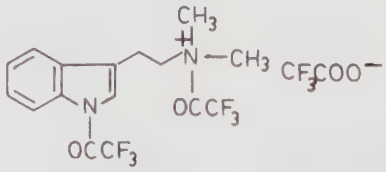


Abb. 17: IR von N,N-Dimethylphenetylammoniumtrifluoracetat

Aus den MS und IR-Spektren geht hervor, daß eine $COCF_3$-Gruppe am Seitenkettenstickstoff gebunden sein muß. Ob das Molekül als tetrasubstituierte Ammoniumverbindung oder als neutrales Teilchen vorliegt, war auf diese Weise nicht zu entscheiden. Folgende Überlegungen und Experimente gaben der Annahme einer salzartigen Struktur recht:

1) Im GC erscheint unter keinen Bedingungen ein Signal, das Molekül ist also nicht verdampfbar. Jede neutrale Trifluoracetylverbindung wäre aber flüchtiger als die entsprechende Ausgangsverbindung, die jedoch ebenfalls im GC erscheint. Wie auf Seite 77 erwähnt, sind die Derivate so stabil, daß sie sich unter gaschromatographischen Bedingungen auch nicht zersetzen können.

2) Elementaranalyse: Die in zwei Analysen gefundenen Werte des DMT-Produktes liegen nahe an den berechneten Werten für folgende Struktur:



Element	Ber. (%)		Gef. (%)	
	$COCF_3$-Salz	H^+-Salz	1.	2.
C	43.74	48.25	42.33	41.84
H	3.06	4.05	3.21	3.39
N	5.66	7.03	5.31	5.42
F	34.59	28.62	29.07	32.63

3) Eine osmometrische Molekulargewichtsbestimmung in Aceton mit Benzil als Eichsubstanz ergab für das DMT-Produkt ein Molekulargewicht von 533. Die in 2) postulierte Verbindung besitzt ein MG von 494, weicht Also weniger als 10% vom berechneten Wert ab. Allerdings zeigt dieses Molekulargewichtsbestimmungsverfahren, da es auf der Messung von kolligativen Eigenschaften beruht, eine Abhängigkeit vom Dissoziationsgrad der gemessenen Verbindung:

$$MG = 1000 \frac{(1 + \alpha)\ RTM_e}{\pi\ M_l}$$

α = Diss.-Grad

π = osmotischer Druck

M_e = Einwaage Substanz

M_l = Einwaage Lösungsmittel

Das Molekül kann in diesem Fall zumindest in Aceton nicht dissoziiert vorliegen, da sonst etwa das doppelte Molekulargewicht herauskommen müßte.

Endgültige Aufklärung sollten die NMR-Spektren bringen. Auch hier wurde N,N-Dimethylphenetylamin als Modellverbindung eingesetzt, da das Molekül nur ein Stickstoffatom enthält und übersichtlichere Spektren liefert.
Das gekoppelte ^{13}C-NMR-Spektrum zeigte, daß die gesamte aliphatische Seitenkette unverändert vorliegt. Gleichzeitig traten die Signale einer $COCF_3$-Gruppe auf.

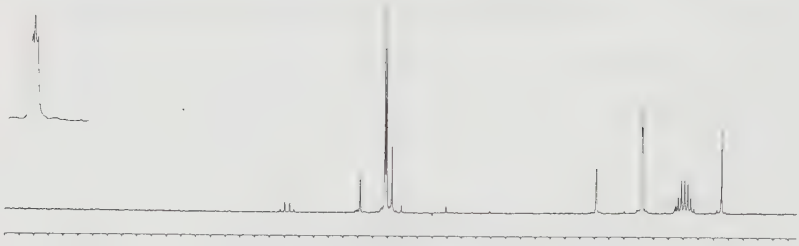


Abb. 18: ^{13}C-NMR von "$COCF_3$-Salz" des N,N-Dimethylphenetylamins in DMSO d_6, breitbandentkoppelt

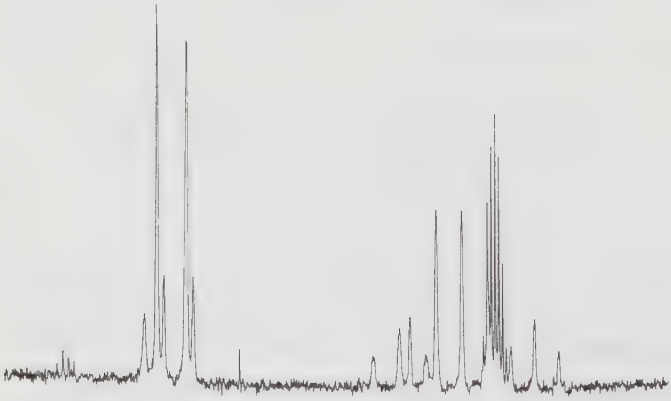


Abb. 19: ^{13}C-NMR von "$COCF_3$-Salz" des N,N-Dimethylphenetylamins in DMSO d_6, ^{1}H-gekoppelt

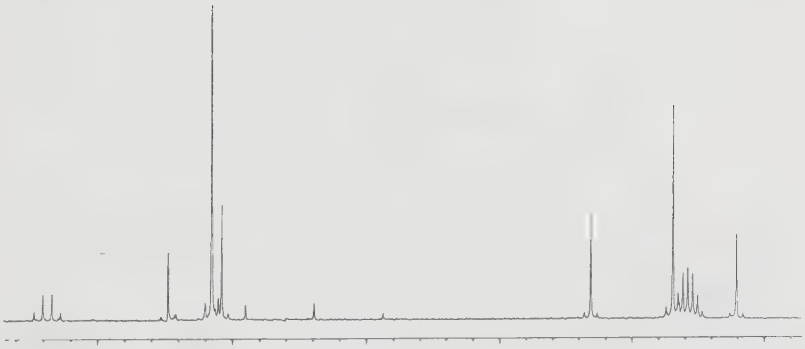
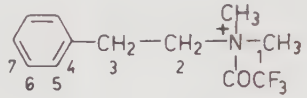


Abb. 20: ^{13}C-NMR von "H^+-Salz" des N,N-Dimethylphenetylamins in DMSO d_6, breitbandentkoppelt

Abb. 21: ^{19}F-NMR von "$COCF_3$-Salz" des N,N-Dimethylphenetylamins in $CDCl_3$

Im Vergleich zur freien Base sind die drei aliphatischen Gruppen tieffeldverschoben, am meisten 1 und 2, am wenigsten 3. Dies befürwortet eine positive Ladung am Stickstoff.



Da auch alle aromatischen C-Atome außer dem quartären C 4 als Dubletts auftreten, kann die $COCF_3$-Gruppe nur am Stickstoff lokalisiert sein.

Das ^{13}C-NMR-Spektrum des entsprechenden H^+-Salzes ist vom obigen Spektrum deutlich verschieden:

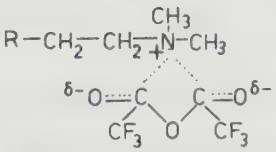
C-Atom	$COCF_3$-Salz	H^+-Salz	freie Base (in ppm)
1	51.23-51.93	42.36	43.83
2	65.82	57.77	60.84
3	28.56	30.25	33.53

Ebenfalls nur ein Signal zeigt das ^{19}F-NMR-Spektrum des $COCF_3$-Salzes des N,N-Dimethylphenetylamins. Dieses erscheint bei 72.62 ppm. Das Signal des H^+-Salzes liegt bei 74.09 ppm.

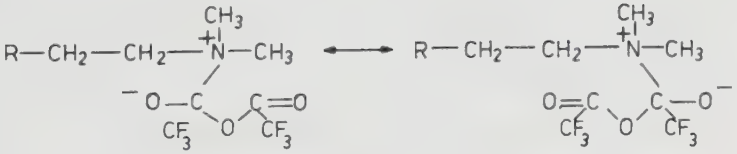
Nach den hier aufgeführten Ergebnissen ist es eindeutig, daß es sich bei dem isolierten Produkt nicht um das H^+-Salz der freien Basen handeln kann. Unter Berücksichtigung der NMR-Spektren bleibt nur folgende Möglichkeit:

Der Stickstoff befindet sich in schnellem Wechsel in der Bindung mit den beiden Kohlenstoffatomen der C=O-Gruppen, sodaß unter

den NMR - Meßbedingungen zwei gleichwertige CF_3 - und CO-Gruppen vorliegen.

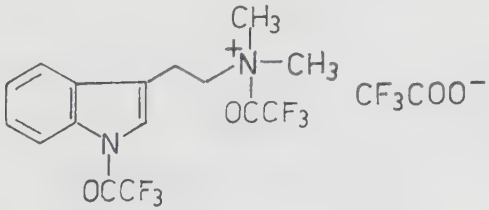


Nicht klassische Struktur



in der NMR-Zeitskala rasch äquilibrierende Strukturen

Aus den spektroskopischen Untersuchungen konnte nicht festgestellt werden, ob die Verbindung auch als Feststoff in dieser Form vorliegt oder ob dort die folgende Struktur maßgeblich ist:

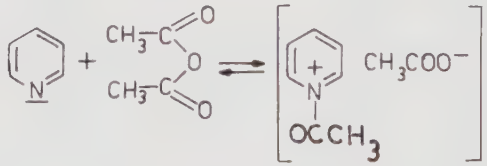


Zwar zeigen die IR-Spektren der Feststoffe ebenfalls nur zwei bzw. eine CO-Valenzschwingung , doch könnte eine weitere durchaus überdeckt sein.

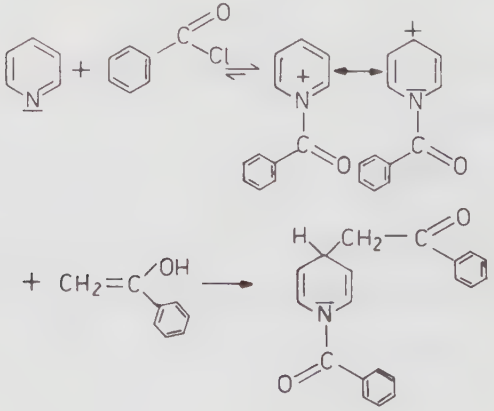
Bei der Umsetzung von N,N-dimethylierten Indolaminen wie DMT und Bufotenin mit TFAA erfolgt also außer Trifluoracetylierung am Indolstickstoff ein Angriff von TFAA auf die elektronenreiche Dimethylaminogruppe.

Untersuchungen über andere N-Trifluoracetylammoniumacetate liegen ausführlichen Literaturstudien zufolge nicht vor.

Derselbe Reaktionstyp tritt jedoch bei durch Pyridine katalysierte Acetylierungen mit Acetanhydrid auf. Diese sollen mechanistischen Untersuchungen zufolge über eine N-Acetylpyridiniumacetatzwischenstufe verlaufen[98-104] :



So konnten Doering et al. durch Umsetzung von Pyridin mit Benzoylchlorid das Zwischenprodukt durch Abfangen mit Acetophenon zu 1-Benzoyl-4-Phenacyl-1,4-Dihydropyridin nachweisen:[105]



Nach Höfle et al.[106] sowie Adkins und Thompson[107] konnten die N-Acylpyridiniumhalogenide als kristalline Feststoffe isoliert und durch Tieftemperatur-NMR-Spektroskopie identifiziert werden. Ebenfalls isoliert wurden N-Acetyl-N'-methylimidazolchlorid[108] und N-Acyltrimethylammoniumhalogenide[109].

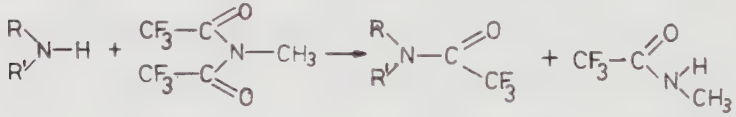
Von den N-Acylpyridiniumacetaten konnten bisher nur 4-Dimethylamino-N-Acetylpyridiniumacetat und 4-Pyrrolidino-N-acetylpyridiniumacetat in aprotischen Lösungsmitteln durch Tieftemperatur-NMR nachgewiesen werden. Keines der Acetate konnte nach [106] bis heute isoliert werden. Die Salze sollen in Lösung nur zu einem bestimmten Prozentsatz auftreten, wobei ein schnelles Gleichgewicht zwischen diesem und den Ausgangsverbindungen formuliert wird.

Die auf Seite 67 formulierte Struktur stellt damit auch hier einen neuen Vorschlag dar.

2.3 DERIVATISIERUNG MIT N-METHYL-BISTRIFLUORACETAMID (MBTFA)

MBTFA hat gegenüber den fluorierten Säurechloriden und Säureanhydriden zwei unterschiedliche Eigenschaften:

1) Bei der Reaktion entsteht keine freie Säure sondern das neutrale Amid, sodaß bei N,N-dimethylierten Verbindungen keine Reaktion wie unter 2.2 beschrieben auftreten kann.



2) Es ist weniger reaktiv und sollte daher selektiver trifluoracetylieren, es sollten also weniger Nebenprodukte entstehen als mit TFAA.

Nach Donike[89,110] reagieren primäre und sekundäre Amine unter milden Bedingungen schnell und quantitativ. Durch Derivatisierung mit einem Gemisch aus MBTFA und MSTFA wurden die Trimethylsilyl-Trifluoracetylderivate von (2), (5), (3) und (21) massenspektroskopisch nachgewiesen.[111]

Zur Untersuchung der optimalen Derivatisierungsbedingungen wurde das betreffende Indolamin mit einem definierten Überschuß von MBTFA umgesetzt und die Produktverteilung direkt aus der Reaktionslösung gaschromatographisch verfolgt.

Bei (2) ließ sich die Reaktion bis zu einer Temperatur von etwa 100° C einheitlich lenken, wenn die Reaktionszeiten nicht zu lang wurden. Die optimalen Bedingungen lagen bei 1 Stunde und 95° C.

Hier entstand nahezu ausschließlich (22).

Bei höheren Temperaturen und längeren Reaktionszeiten wurden in zunehmendem Maße die mehrfach acetylierten Produkte gebildet.

Tabelle 3: Produktverteilung unter verschiedenen Bedingungen.

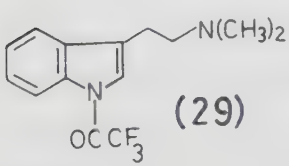
Temp.(°C)	Zeit(Min.)	(22)/%	(23)/%	(24)/%
80	90	93		
95	60	94	5	1
95	120	65	21	14
95	180	52	28	20
137	60	5	65	30

Daß der Indolstickstoff mit MBTFA erheblich langsamer reagiert als der aliphatische Seitenkettenstickstoff, zeigte sich bei den Derivatisierungsversuchen mit DMT und Bufotenin:

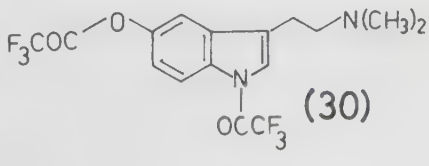
Erst nach zwei Stunden bei 95-100° C konnte hier eine vollständige Umsetzung beobachtet werden. Bei kürzeren Reaktionszeiten war im GC immer noch nicht umgesetzter Ausgangsstoff nachweisbar.

Bei Temperaturen um 60° C war die Umsetzung auch nach eintägiger Reaktion noch nicht vollständig.

Die Derivatisierungsprodukte wurden durch MS, DMT auch durch NMR und IR identifiziert.



(29)

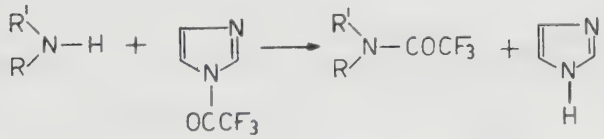


(30)

Die einheitliche Derivatisierung von Indolaminen ist mit MBTFA also möglich, allerdings unter unterschiedlichen Bedingungen. DMT, Bufotenin und die einfach methylierten Verbindungen wie NMT oder Tryptamin können demnach nicht gleichzeitig nebeneinander nachgewiesen werden.

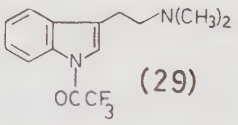
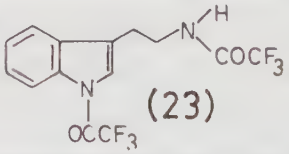
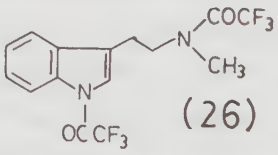
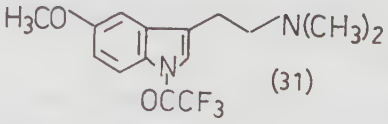
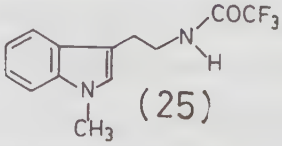
2.4 DERIVATISIERUNG MIT TRIFLUORACETYLIMIDAZOL (TFAI).

TFAI acetyliert Amine und Alkohole unter Bildung der entsprechenden Ester bzw. Amide und Imidazol:

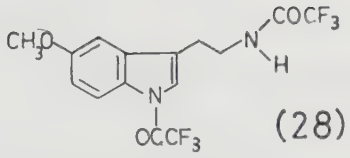


Es ist reaktiver als MBTFA, da das freie Elektronenpaar des der Trifluoracetylgruppe benachbarten Stickstoffs im Ring delokalisiert ist. Damit ist der Carbonylkohlenstoff noch elektronenärmer.
TFAI soll in seiner Reaktivität sogar den trifluoracetylierten Anhydriden gleichkommen.
Die analoge Verbindung Heptafluorbutyrylimidazol wurde bereits zur Derivatisierung verschiedener Indolamine herangezogen, unter anderem von DMT, welches aus Cerebrospinalflüssigkeit auf diese Weise nachgewiesen werden konnte.[65,112)]
Präparativ wurden Acetylierungen mit TFAI zur Synthese von Carbonsäureestern, Amiden, Hydraziden und Hydroxamsäuren angewendet.[113,114)]
Die Umsetzungen wurden mit einem mindestens zehnfachem Überschuß TFAI ohne Lösungsmittel durchgeführt, da sich sehr bald herausstellte, daß diese keinen Vorteil bringen.
Es zeigte sich, daß bei 60° C und 20 Minuten Reaktionszeit bei allen untersuchten Indolaminen einheitliche Reaktionsführung möglich war. Bei höheren Temperaturen konnte die Bildung von Nebenprodukten nicht unterdrückt werden.

Die folgenden Indolamine konnten durch Umsetzung mit TFAI bei 20 Min./ 60°C als Trifluoracetylderivate gaschromatographisch getrennt und mit Hilfe spektroskopischer Untersuchungen eindeutig identifiziert werden:

Ausgangsverbindung	Derivat
(7)	 (29)
(2)	 (23)
(3)	 (26)
(8)	 (31)
(4)	 (25)

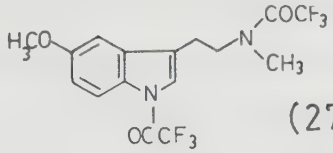
(5)



(28)

---

(6)



(27)

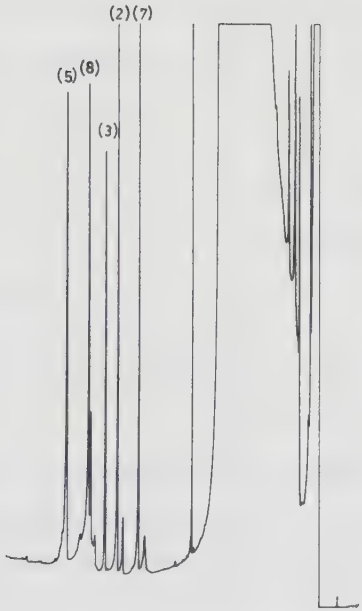


Abb. 22 : GC der Produkte der Derivatisierung mit TFAI.

Säule a), IT 350° C, 100-280° C, Heizrate 8°/Min.

Da bei der Derivatisierung ein großer Überschuß TFAI verwendet wird, dieses aber nicht durch Abblasen entfernt werden kann, erscheint im Chromatogramm ein starkes, breites Signal. Bei Analysen im Spurenbereich, vor allem bei Verwendung eines ECD, nimmt die Signalbreite so überhand, daß eine Detektion der zu untersuchenden Substanzen unmöglich wird. Der Reagenzüberschuß muß daher vor der Injektion entfernt werden.

In der Literatur sind dafür mehrere Verfahren beschrieben:

a) Zerstörung des TFAI mit Wasser. Dabei entsteht jedoch TFA, durch Säurekatalyse werden die Derivate zerstört.

b) Das gekühlte Reaktionsgemisch wird mit n-Hexan extrahiert, die vereinigten Extrakte werden auf -14°C gekühlt, wobei TFAI ausfällt.

Letztere Methode erwies sich als experimentell unpraktisch, da große Mengen n-Hexan benötigt werden, welche nachher wieder abgeblasen werden müssen.

Als alternative Möglichkeit wurde versucht, mit niedrig siedenden Alkoholen bzw. Aminen Derivate mit dem überschüssigen Reagenz zu bilden, welche dann aufgrund ihrer unterschiedlichen Flüchtigkeit abgeblasen werden können.

Untersucht wurden Methanol, Tert.-Butylamin, Isopropylamin und Diethylamin. Dazu wurde das Reaktionsgemisch der Derivatisierung mit einem Überschuß der entsprechenden Substanz versetzt und die Veränderung der Signale im GC vor und nach Zugabe beobachtet. Sämtliche Verbindungen reagierten spontan mit TFAI, gleichzeitig erfolgte jedoch Reaktion mit der $COCF_3$-Gruppe am Indolstickstoff der Derivate, welche in diesem Fall also selbst als Acetylierungsreagenzien wirkten.

2.5 EIGENSCHAFTEN DER TRIFLUORACETYLDERIVATE.

Ein wichtiger Aspekt ist die Stabilität der Derivate sowie deren Verhalten gegenüber acetylierbaren Verbindungen.
Um die Reaktivität der N-$COCF_3$-Gruppen kennenzulernen, wurden die Derivate von (2) und (7) mit Diethylamin, Methanol und Wasser umgesetzt und die Reaktionsprodukte untersucht.
Bei der Einwirkung von Diethylamin auf (23) entstand in kürzester Zeit (22), welches gaschromatographisch aus der Retensionszeit sowie spektroskopisch in einem präparativen Ansatz nachgewiesen wurde. Während also die Indol-N$COCF_3$-Gruppe durch Diethylamin sofort abgespalten wird, ist die Trifluoracetylgruppe am Seitenkettenstickstoff auch bei längerem Einwirken in der Hitze stabil.
Gegenüber Methanol erwies sich die Indolgruppierung resistenter. Hier mußte bereits einige Minuten auf etwa 60° C erhitzt werden, bis ein Teil abgespalten wurde.
Sehr stabil verhielten sich die Derivate gegenüber Wasser, hier konnte auch nach längerem Erhitzen keine Zersetzung beobachtet werden.
Sämtliche Trifluoracetylderivate außer dem des DMT wurden präparativ als farblose Kristalle erhalten. Das DMT-Derivat konnte auf keine Weise zur Kristallisation gebracht werden, es lag als farbloses Öl vor.
Die Verbindungen (23),(26),(25) wurden synthetisiert durch Umsetzung der entsprechenden Indolamine mit TFAA bei 45-50° C in Dichlormethan.
(22) wurde erhalten durch Umsetzung von (23) mit einem

Diethylaminüberschuß.

Verbindung (29) wurde durch Umsetzung von (7) mit TFAI und nachfolgende Destillation hergestellt.

Tabelle 4 : Eigenschaften der Derivate.

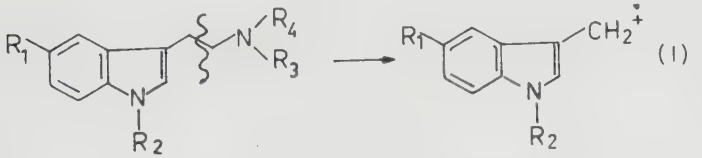
Verbindung	Aussehen	Fp.	Fp.Ausg.-Verb.
(23)	farbloses Pulver	153°	118°
(26)	weiße Nadeln	59-60°	88°
(25)	weiße Nadeln	91°	
(22)	farbloses Pulver	92-93°	118°
(29)	Öl		47-49°

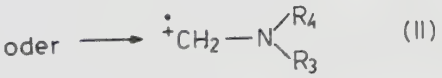
2.6 SPEKTROSKOPISCHE UNTERSUCHUNGEN.

2.6.1 MASSENSPEKTREN.

Die Massenspektren der Trifluoracetylderivate von Indolaminen sind vor allem durch zwei Hauptspaltungsreaktionen gekennzeichnet:

Durch Bindungsbruch zwischen dem α-ständigen und dem β-ständigen Kohlenstoffatom der Seitenkette entstehen zwei Bruchstücke, welche die positive Ladung stabilisieren können.

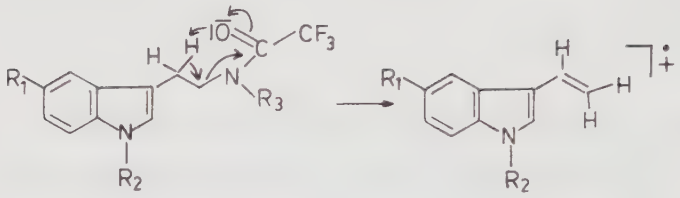




Welches Signal die größere Intensität besitzt, d.h., welches Bruchstück bevorzugt die positive Ladung trägt, hängt von den Substituenten R_3 und R_4 ab. Für R_3 bzw. R_4 = H oder $COCF_3$ tritt immer (I) vorrangig auf. Für R_3 bzw. R_4 = CH_3, also bei (7), (8) und (9) wird (II) derartig vorherrschend, daß es alle anderen Signale in den Schatten stellt. Dies unterstützt auch die Tatsache, daß bei diesen Verbindungen kein M^+-Peak auftritt, lediglich ein $M^+ - 1$ Signal ist mit sehr kleiner Intensität sichtbar. Bei allen anderen Verbindungen tritt M^+ deutlich hervor.

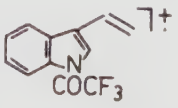
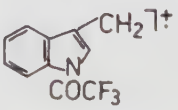
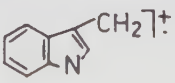
Durch eine Mc Lafferty Umlagerung wird die zweite Hauptspaltungs-

reaktion eingeleitet:



Diese Signale sind normalerweise sehr intensiv, wenn die Mc Lafferty Umlagerung nicht sterisch gehindert ist.
Einige Untersuchungsergebnisse über Massenspektren von Amin-Trifluoracetylderivaten und Fragmentierungsschemata sind in[115] veröffentlicht.

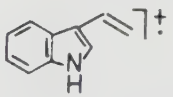
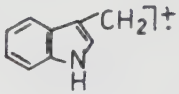
Verbindung (23):

m/e	I (%)	Zuordnung
352	24	M^+-Peak
256	1	$M^+ - COCF_3$
239	100	
226	100	
142	11	
129	31	

Verbindung (26):

m/e	I (%)	Zuordnung
366	8	M^+-Peak
239	100	wie (23)
226	45	wie (23)
140	24	CH_2-N $\begin{matrix}COCF_3\\CH_3\end{matrix}$
129	11	wie (23)
115	6	wie (23)

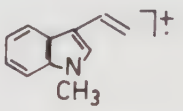
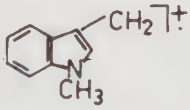
Verbindung (22):

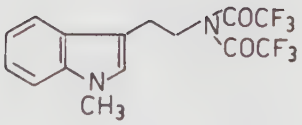
m/e	I (%)	Zuordnung
256	19	M^+-Peak
143	17	
130	100	

Verbindung (24):

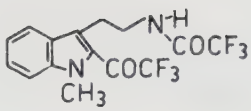
m/e	I (%)	Zuordnung
448	40	M^+-Peak
239	30	wie (23)
226	100	wie (23)

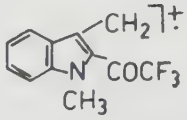
Verbindung (25):

m/e	I (%)	Zuordnung
270	18	M^+-Peak
157	6	
144	100	



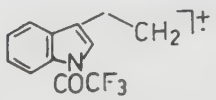
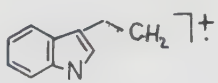
m/e	I (%)	Zuordnung
366	8	M^+-Peak
270	12	$M^+ - COCF_3$
157	4	wie (25)
144	100	wie (25)



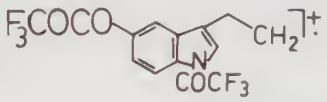
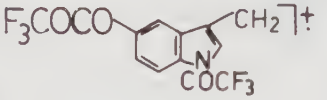
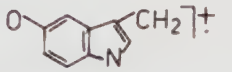
m/e	I (%)	Zuordnung
366	30	M^+-Peak
240	100	
143	22	wie (25)

Aus m/e 240 folgt, daß eine $COCF_3$-Gruppe am Ringgerüst liegen muß. Mechanistischen Überlegungen zufolge sollte dies die 2-Stellung sein.

Verbindung (29):

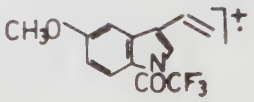
m/e	I (%)	Zuordnung
240	1	
143	1	
129	2	wie (23)
115	2.2	wie (23)
58	100	CH_3 CH_3 N - CH_2^+

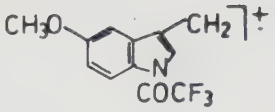
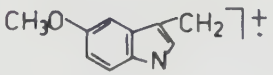
Verbindung (30):

m/e	I (%)	Zuordnung
395	0.4	$M^+ - 1$
352	0.5	
338	0.6	
144	1.8	
128	0.6	wie (23)
58	100	wie (29)

Sowohl bei (29) als auch bei (30) wird das MS durch m/e 58 bestimmt, da dieses Bruchstück aufgrund der Ladungsstabilisierung extrem stabil ist. Der M^+-Peak tritt aus demselben Grunde nicht auf.

Verbindung (28):

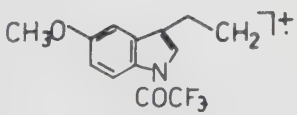
m/e	I (%)	Zuordnung
382	46	M^+-Peak
269	74	

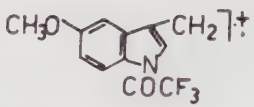
256	100	
159	60	
144	21	wie (30)

Verbindung (27):

m/e	I (%)	Zuordnung
396	20	M^+-Peak
269	100	wie (28)
256	75	wie (28)
159	42	wie (28)
144	16	wie (30)
140	32	wie (26)

Verbindung (31):

m/e	I (%)	Zuordnung
313	0.2	M^+ - 1
270	0.7	

256	0.4	
159	2.5	wie (27)
144	2.3	wie (30)
58	100	wie (30)

2.6.2 IR-SPEKTREN.

Zur Strukturaufklärung der Trifluoracetylderivate von Indolaminen eignet sich die IR-Spektroskopie in besonderem Maße, da sowohl Carbonylgruppen als auch NH-Gruppen charakteristische intensive Banden ergeben. Aus dem Auftreten bzw. Fehlen einer solchen Bande kann daher unter Berücksichtigung der Massenspektren auf den Trifluoracetylierungsgrad und auf die Stellung der $COCF_3$ - Gruppe geschlossen werden.

Die Spektren sämtlicher dargestellter Derivate sind im Bereich von 1400 - 1600 cm^{-1} fast identisch. Die charakteristischen Unterschiede liegen im Bereich der C=O - Valenzschwingung zwischen 1650 und 1800 cm^{-1} sowie der NH-Streckschwingung zwischen 3000 und 3500 cm^{-1}. Die indolische und die aliphatische $NCOCF_3$-Gruppe lassen sich anhand der Wellenzahl der C=O-Schwingung leicht unterscheiden:

Während am aliphatischen Stickstoff gebundenes C=O um 1700 bis 1685 cm^{-1} erscheint, tritt das indolisch gebundene C=O um

1730 cm^{-1} auf. Bei zweifacher Trifluoracetylierung treten beide Banden nebeneinander auf.

Genauso verhält es sich mit den NH-Schwingungen: Die aliphatische NH-Bande erscheint zwischen 3310 und 3350 cm^{-1}, die indolische bei 3400 cm^{-1}. Auch hier sind im Falle von (22) zwei NH-Banden nebeneinander erkennbar.

Tabelle 5 : C=O und N-H -Banden von Trifluoracetylderivaten.

	cm^{-1}			
Verbindung	C=O Indol.	C=O aliphat.	N-H Indol.	N-H aliph.
(23)	1728	1700		3350
(22)		1700	3400	3320
(26)	1728	1685		
(25)		1700		3310
(29)	1730			

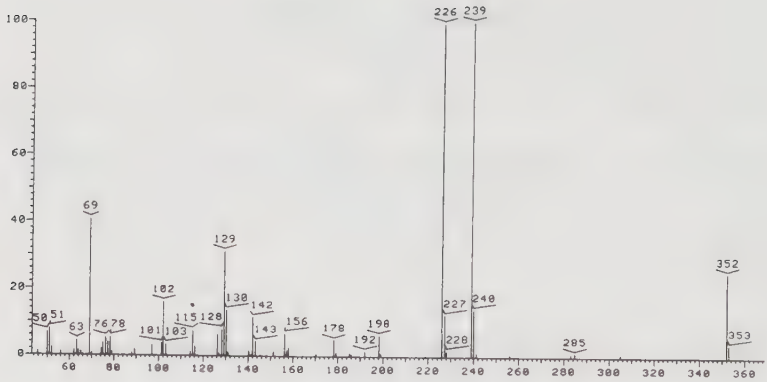


Abb. 23: MS von (23)

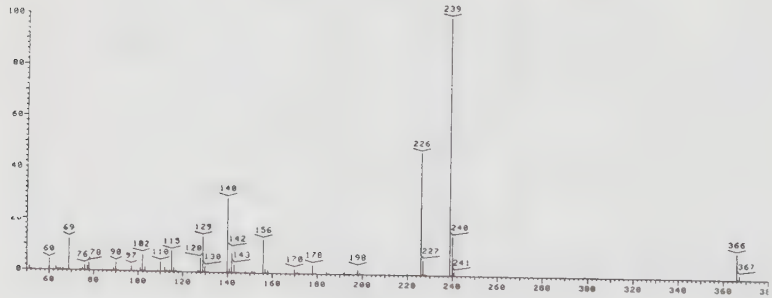


Abb. 24: MS von (26)

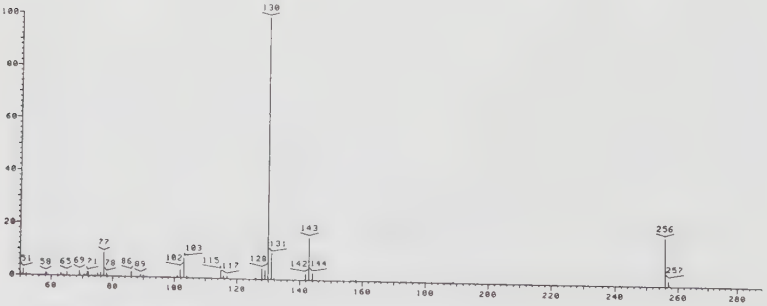


Abb. 25: MS von (22)

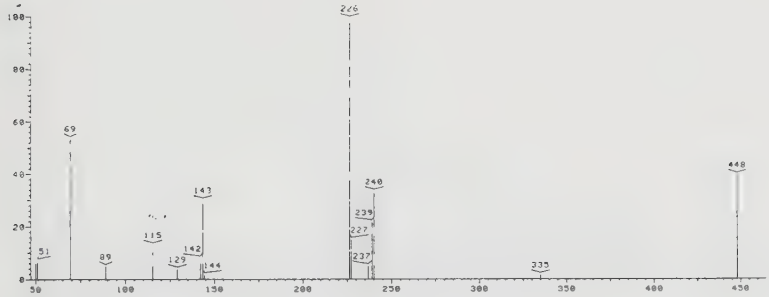


Abb. 26: MS von (24)

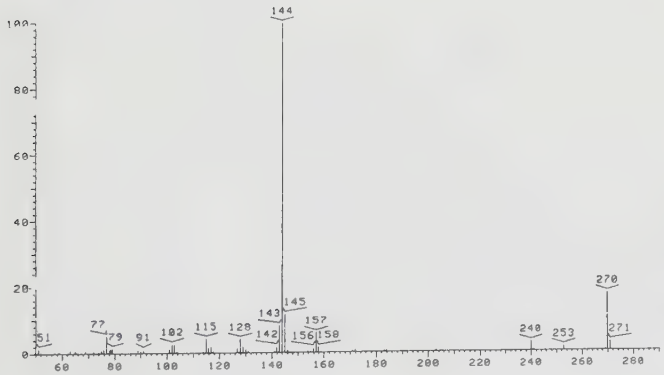


Abb. 27: MS von (25)

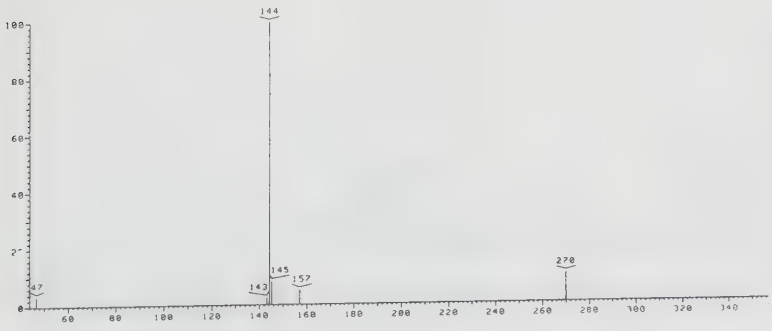


Abb. 28: MS von w-N,N-bis-Trifluoracetyl-1-methyltryptamin

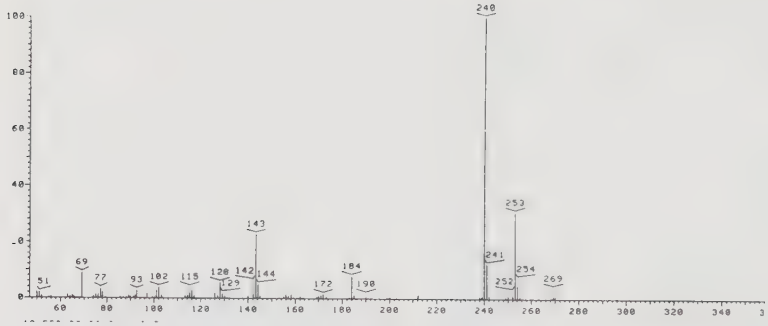


Abb. 29: MS von wN-Trifluoracetyl-2-Trifluoracetyl-1-Methyltryptamin

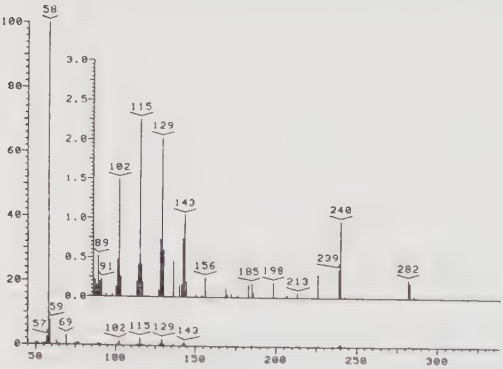


Abb. 30: MS von (29)

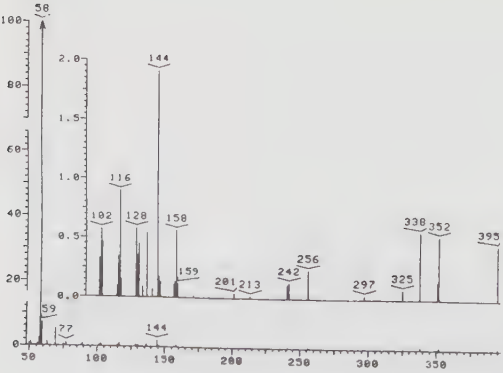


Abb. 31: MS von (30)

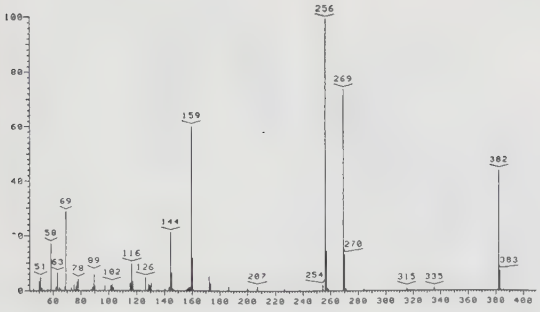


Abb. 32: MS von (28)

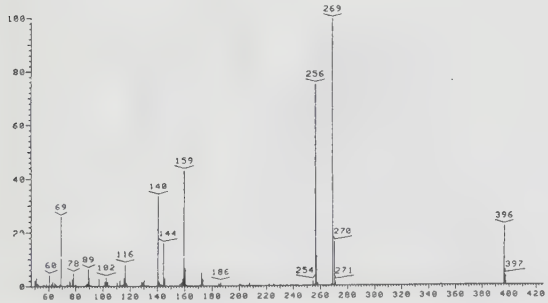


Abb. 33: MS von (27)

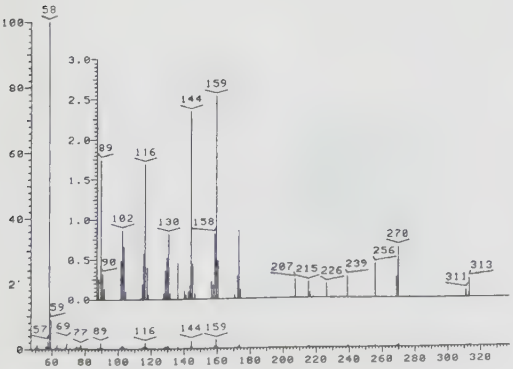


Abb. 34: MS von (31)

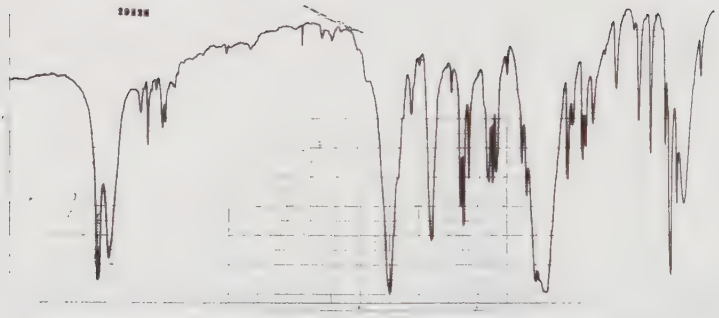


Abb. 35: IR von (22)

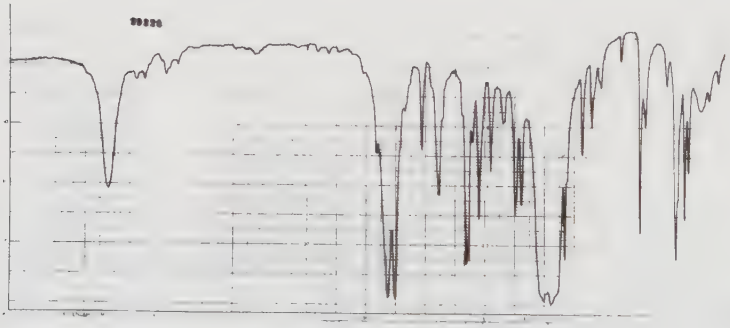


Abb. 36: IR von (23)

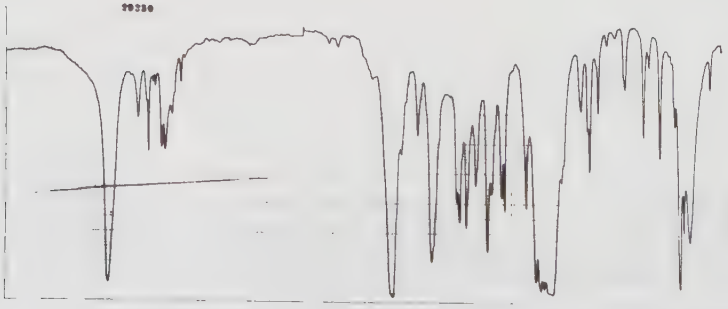


Abb. 37: IR von (25)

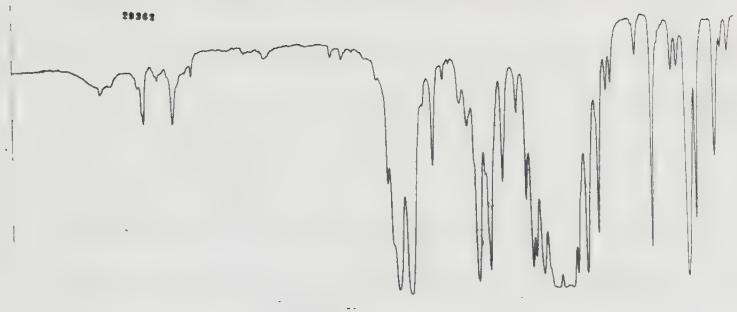


Abb. 38: IR von (26)

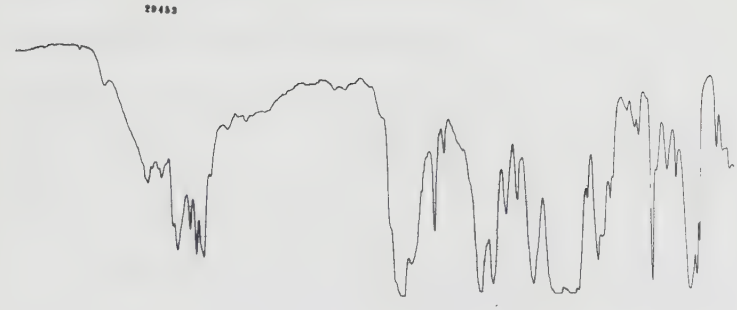
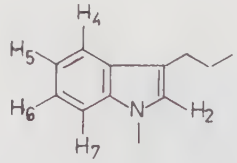


Abb. 39: IR von (30)

2.6.3 ^{1}H-NMR-SPEKTREN.

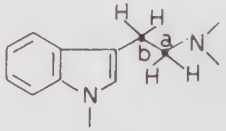
Die ^{1}H-NMR-Spektren der trifluoracetylierten Indolamine zeigen charakteristische Unterschiede zu denen der underivatisierten Ausgangsverbindungen:

Im Tieffeldbereich tritt eine deutliche Aufspaltung der Aromatenprotonen H_4-H_7 und H_2 auf, falls der Indolstickstoff trifluoracetyliert ist. Gleichzeitig verschwindet das breite Signal der indolischen NH-Gruppe, welches im Tryptamin bei 8.45 ppm erscheint.



Die Tieffeldverschiebung von H_2 ist auf den entschirmenden Effekt der Trifluoracetylgruppe am benachbarten Stickstoff zurückzuführen, sie ist vergleichsweise stärker als die Tieffeldverschiebung von H_4-H_7, welche gegenüber den freien Indolaminen erkennbar ist.

Eine weitere charakteristische Aufspaltung erfolgt, falls am Seitenkettenstickstoff eine Trifluoracetylgruppe sitzt:



Im Tryptamin selbst ergeben diese vier Protonen ein Multiplett zwischen 2.80 und 3.15 ppm.

Bei Trifluoracetylierung erfolgt eine deutliche Aufspaltung der beiden CH_2-Gruppen. Die Protonen von b) erscheinen, wie zu

erwarten, als Triplett bei 3.03 ppm. Die Protonen von a) ergeben ebenfalls ein Triplett bei 3.77 ppm, wenn sich am Seitenkettenstickstoff kein Wasserstoff befindet. Liegt jedoch eine $NHCOCF_3$-Gruppe vor, so koppeln die Protonen von a) mit den NH-Protonen, und es erfolgt eine weitere Aufspaltung zu einem Quartett. Daß das Quartett tatsächlich von dieser Kopplung herrührt und nicht von der Fernkopplung der b) -Protonen mit H_2, konnte durch Deuterierung der NH-Gruppe bewiesen werden: In diesem Fall wurde zwischen 3.6 und 3.8 ppm ein Multiplett beobachtet, welches durch Kopplung der a)-Protonen mit Deuterium zu erklären ist. Eine weitere Tieffeldverschiebung tritt für das NH-Proton ein, wenn der Seitenkettenstickstoff trifluoracetyliert wird: Im Tryptamin selbst erscheinen die NH_2-Protonen bei 1.25 ppm, bei (23) tritt das NH-Signal bei 6.5 ppm auf.

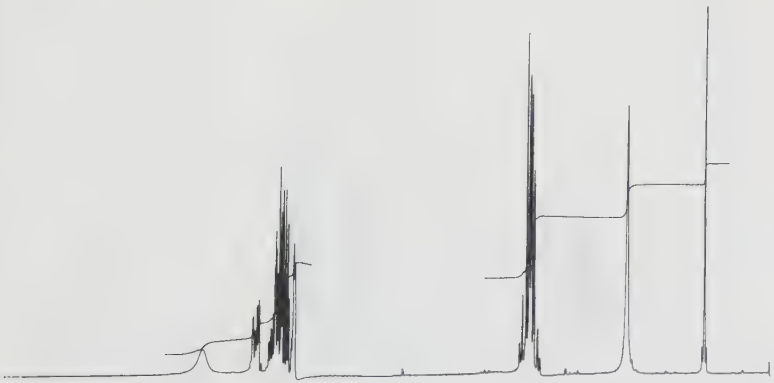


Abb. 41: ^{1}H-NMR von (2) in $CDCl_3$

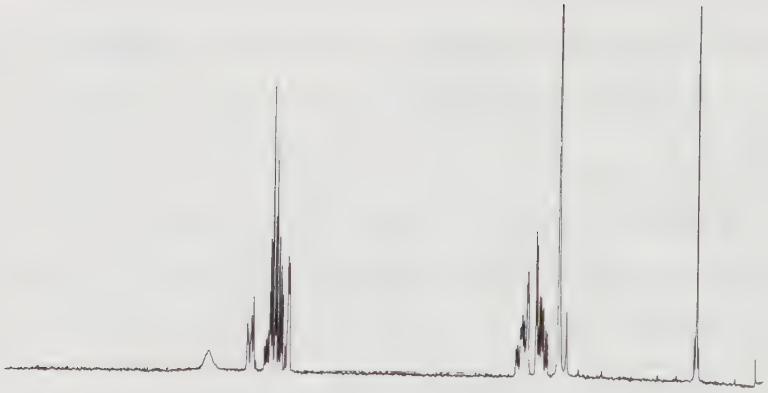


Abb. 42: ^{1}H-NMR von (7) in $CDCl_3$

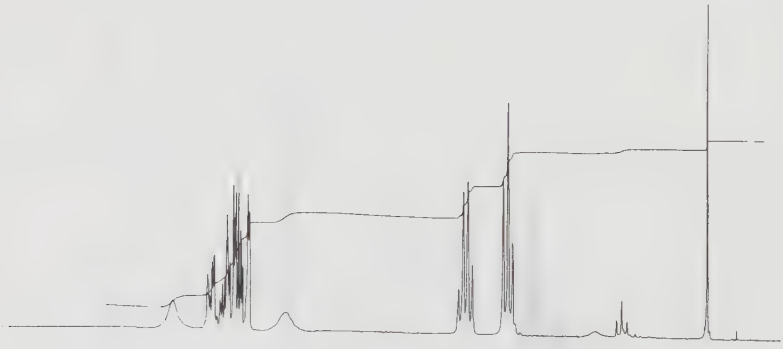


Abb. 43: ^{1}H-NMR von (22) in $CDCl_3$

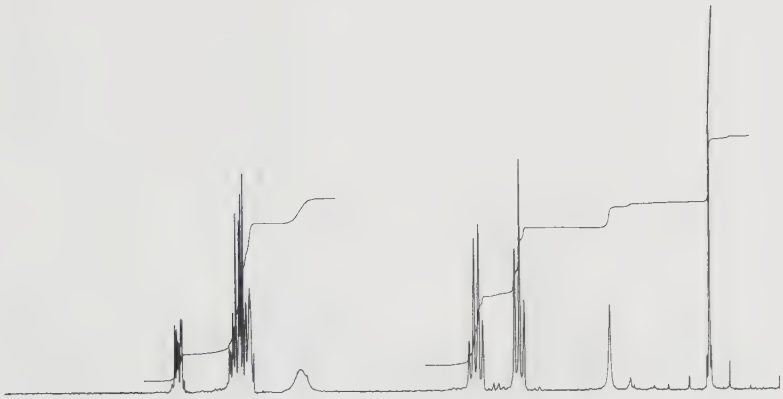


Abb. 44: ^{1}H-NMR von (23) in $CDCl_3$

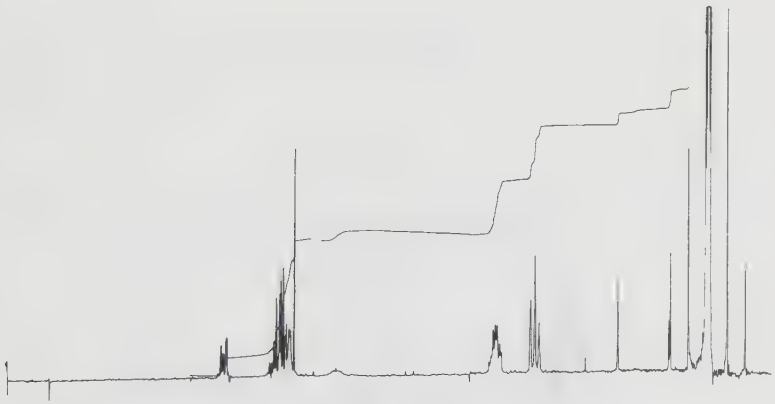


Abb. 45: ^{1}H-NMR von (23) nach Ausschütteln mit D_2O in $CDCl_3$

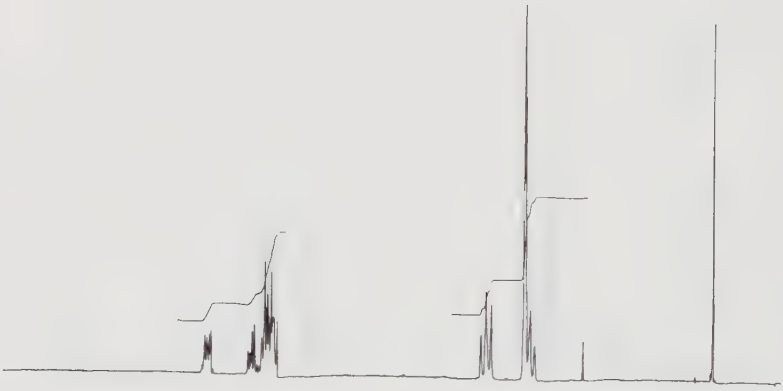


Abb. 46: ^{1}H-NMR von (26) in $CDCl_3$

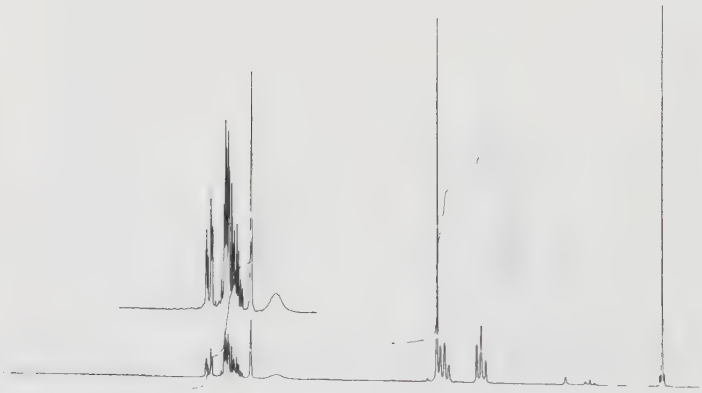


Abb. 47: ^{1}H-NMR von (25) in $CDCl_3$

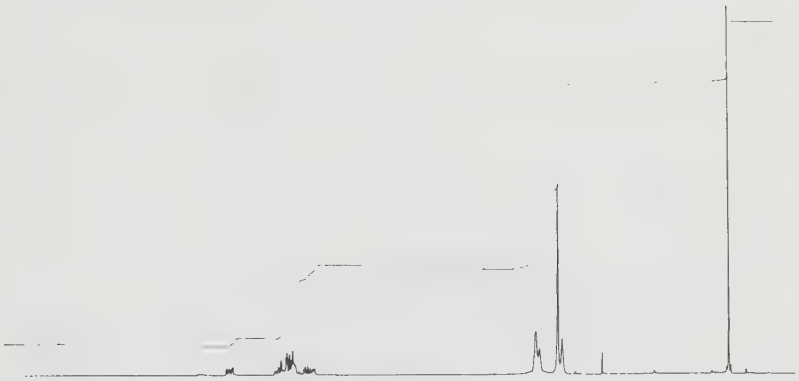
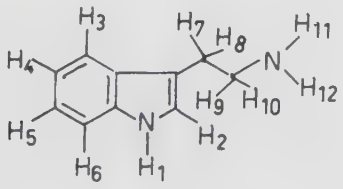


Abb. 48: ^{1}H-NMR von (29) in $CDCl_3$

Die folgende Tabelle zeigt eine Zusammenfassung der einzelnen Daten.

Tabelle **6**: ^{1}H-NMR , chemische Verschiebungen und Kopplungen trifluoracetylierter Indolamine.



Verbindung	Abb.	H_1	H_2	H_3-H_6	H_7,H_8	H_9,H_{10}	$N^{H}_{}{}^{COCF_3}$	$N^{CH_3}_{}{}^{COCF_3}$	$N^{CH_3}_{CH_3}$	$N^{CH_3}_{CH_3}$
(22)	43	8.16	7.63-7.49 M	7.44-7.00 M	3.03 T	3.67 Q	6.45			
(23)	44		8.36-8.55 M	7.31-7.67 M	3.03 T	3.73 Q	6.60			
(26)	46		8.32-8.46 M	7.26-7.73 M	3.03 T	3.77 T		3.85 S		
(25)	47		7.50-7.62 M	7.00-7.35 M	3.01 T	3.65 Q	6.88		3.75 S	
(29)	48		8.54-8.94 M	7.23-7.91 M	2.16 ----	3.36 M				2.55 S

S= Singulett, T= Triplett, Q= Quartett, M= Multiplett

Alle Werte sind in ppm angegeben.

2.6.4 ^{13}C-NMR-SPEKTREN.

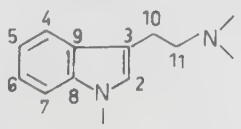
Die ^{13}C-NMR-Spektren trifluoracetylierter Indolamine zeigen einige interessante Merkmale.

Charakteristisch ist das Auftreten von Signalen der $COCF_3$-Gruppen. Durch Kopplung mit den Fluoratomen spaltet die CF_3-Gruppierung in ein Quartett mit Kopplungskonstanten von etwa 14 ppm auf. Zwischen indolischen N-$COCF_3$ und w-N-$COCF_3$ sind nur minimale Unterschiede zu erkennen, die Quartette liegen im Bereich von 94-128 ppm. Die CO-Gruppe spaltet ebenfalls in ein Quartett auf, dessen Kopplungskonstanten jedoch aufgrund der größeren Entfernung der Fluoratome erheblich kleiner sind. Sie betragen etwa 2 ppm. Auch hier liegen die verschiedenen $COCF_3$-Gruppen nahe beieinander, die Schwerpunkte sind bei indolischem N-$COCF_3$ um 155 ppm, bei w-N-$COCF_3$ um 162 ppm.

Der Einfluß der $COCF_3$-Gruppen wird auch im Ringgerüst offensichtlich: Während die Kohlenstoffatome 4-7 bei Trifluoracetylierung keine wesentliche Veränderung erfahren, wird das quartäre C-Atom 8 um ca. 10 ppm tieffeldverschoben. Etwa dieselbe Tieffeldverschiebung tritt am C-Atom 2 auf.

Die folgende Tabelle gibt eine Übersicht über die Werte der chemischen Verschiebungen.

Tabelle 7: ^{13}C-NMR Verschiebungsdaten für trifluoracetylierte Indolamine.



Verbindung	Abb.	C_{10},C_{11}	C_4-C_7	C_2	C_3,C_9	C_8
(22)	49	24.7 40.1	118.4 119.7 122.2 122.5	111.4	126.9 133.4	111.7
(23)	50	24.5 39.3	117.2 119.1 125.8 126.8	121.0	130.1 136.4	122.0
(26)	51	22.1 49.2	117.1 119.2 125.7 126.6	120.9	130.3 136.2	122.2
(25)	52	24.5 40.3	118.5 119.1 121.9 126.9	109.4	127.5 137.2	110.2
(2)		29.6 42.8	118.3 118.5 120.9 122.7	111.5	127.6 136.6	112.8

Alle Werte sind in ppm angegeben.

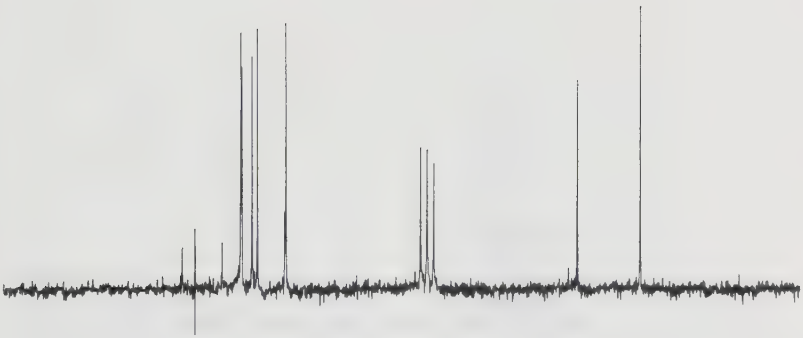


Abb. 49: ^{13}C-NMR von (22) in $CDCl_3$, breitbandentkoppelt

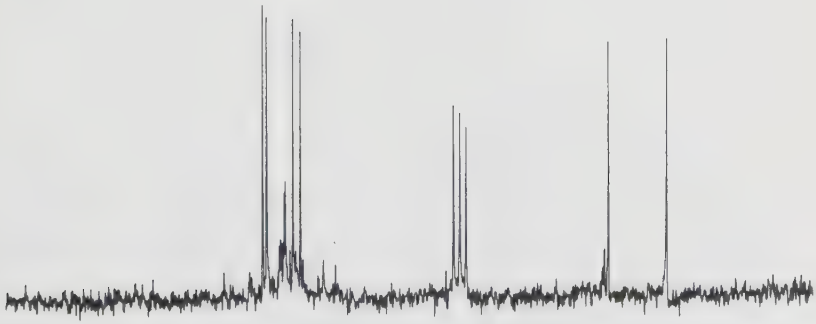


Abb. 50: ^{13}C-NMR von (23) in $CDCl_3$, breitbandentkoppelt

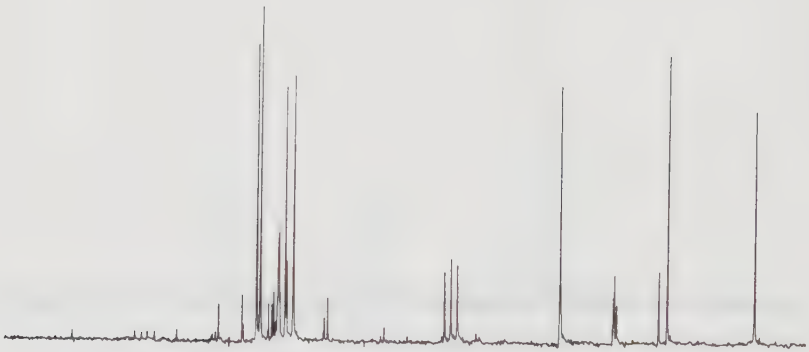


Abb. 51: ^{13}C-NMR von (26) in $CDCl_3$, breitbandentkoppelt

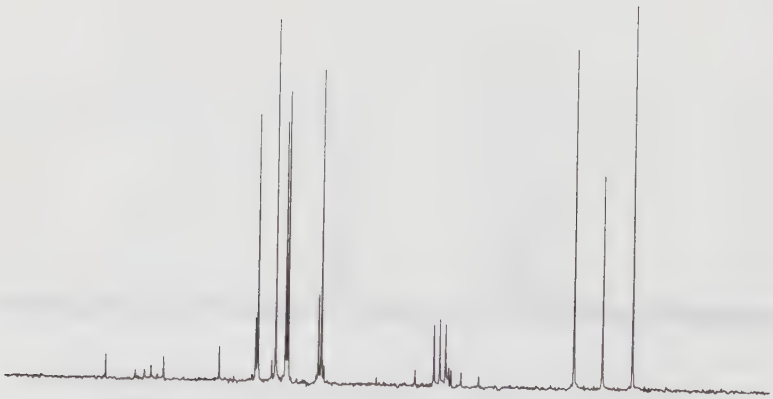
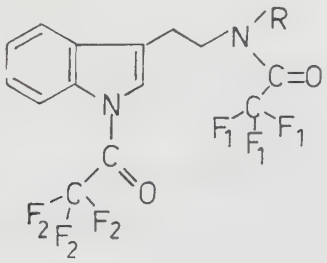


Abb. 52: ^{13}C-NMR von (25) in $CDCl_3$, breitbandentkoppelt

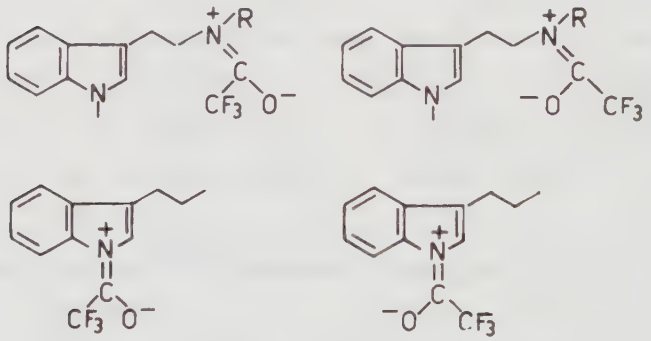
2.6.5 ^{19}F-NMR-SPEKTREN.

Mit Hilfe der ^{19}F-NMR-Spektroskopie läßt sich die Anzahl der Trifluoracetylgruppen in Indolaminen auf einfache Weise bestimmen, da jede Gruppe eine andere chemische Umgebung und damit unterschiedliche Verschiebung besitzt. Die indolische und die aliphatische $NCOCF_3$-Gruppierung sind auf diese Weise eindeutig in ihrer Lage zum internen Standard Trifluoressigsäuremethylester unterscheidbar.
Die Signale erfahren dabei Aufspaltung in Dubletts, die Kopplungskonstanten liegen um 0.8 Hz für F_1 und um 2.3 Hz für F_2. Dies ist bei einer Spreizung von 5 Hz/cm gerade noch erkennbar.



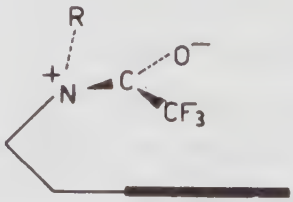
Auf den ersten Blick verwirrend erscheint das Spektrum von wN,1-Bistrifluoracetyl-wN-Methyltryptamin (26). Hier treten insgesamt vier Signalgruppen im Verhältnis 1:1:3:3 auf. In diesem Fall müssen, hervorgerufen durch den Einfluß der Methylgruppe, zwei Stereoisomere in eben diesem Verhältnis vorliegen.
Auffallend ist weiterhin, daß in einem der beiden Isomeren die Reihenfolge der Signale umgedreht ist.
Zur Erklärung der Verschiebungen und Aufspaltungsmuster gibt es zwei Interpretationsmöglichkeiten:

A. Bei Annahme eines Doppelbindungsanteils treten in der Seitenkette und am Indolstickstoff je zwei Konfigurationsisomere auf:



Dadurch erscheinen im ^{19}F-NMR jeweils zwei Signale, die 0.8 bzw. 2.3 Hertz auseinander liegen.

Durch intramolekulare π-Elektronenwechselwirkung erfährt das Molekül eine Ineinanderfaltung, dadurch kommt die $NCOCF_3$-gruppe über der Indolringebene zu liegen:



Im Fall R = H spielt dies für die Aufspaltung keine Rolle, da eine ungehinderte Drehbarkeit gewährleistet sein dürfte. Wird aber R = CH_3, ist dies nicht mehr der Fall, die konformationsmäßige

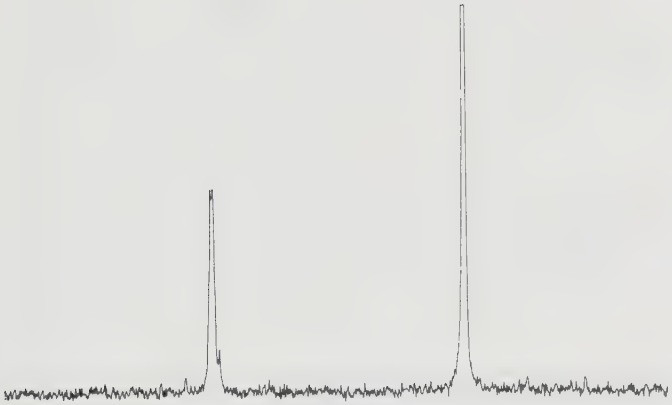


Abb. 53: ^{19}F-NMR von (22) in $CDCl_3$

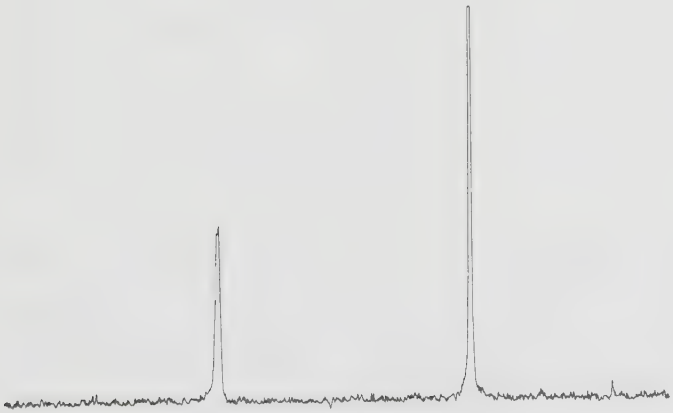


Abb. 54: ^{19}F-NMR von (25) in $CDCl_3$

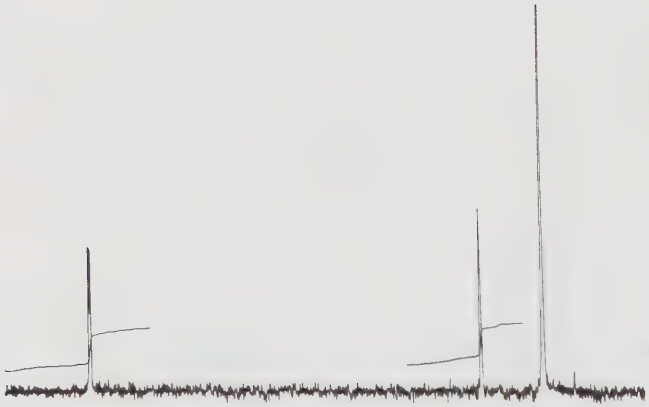


Abb. 55: ^{19}F-NMR von (23) in $CDCl_3$

Abb. 56: ^{19}F-NMR von (26) in $CDCl_3$

Lage von CF_3 ist sozusagen fixiert. Damit treten zwei Konformere auf, deren Fluorsignale im Spektrum im Verhältnis 3:1 vorliegen. Das Verhältnis erscheint plausibel, da einmal die sterisch gehinderte Cis-Konfiguration und einmal die günstigere Transanordnung zwischen CF_3 und CH_3 auftritt.
Die starke Hochfeldverschiebung von F_1 um 1.23 ppm resultiert dann aus der Lage der CF_3-Gruppe über dem Indolring bei Cis-Stellung, während bei Trans-Stellung die Gruppe außerhalb des Rings postiert ist.

B. Durch J-H Fernkopplung spalten F_1 und F_2 in Dubletts mit Kopplungskonstanten von 0.8 Hz bei F_1 und 2.3 Hz bei F_2 auf. Zur Erklärung der vier Signalgruppen im Spektrum von (26) wird angenommen, daß durch den +I - Effekt der CH_3-Gruppierung ein erhöhter Doppelbindungscharakter der N-C-Bindung vorliegt. Damit ist wiederum Cis/Trans-Isomerie möglich und im Spektrum erscheinen die Signale zweier Konfigurationsisomere im Verhältnis 3:1. Die Umkehrung der Reihenfolge der Banden ist auch hier wie in A. nur durch Konformationseinflüsse zu erklären.

Welche Interpretation hier zutrifft, ist mit dem vorhandenen Spektrenmaterial nicht zu beweisen. Weitere Informationen sollten durch temperaturabhängige NMR-Messungen zu erhalten sein.

Die folgende Tabelle gibt eine Übersicht über die einzelnen, den Spektren entnommenen Daten.

Tabelle 8: ^{19}F-NMR Daten von trifluoracetylierten Indolaminen.

Verbindung	F_1(ppm)	F_2(ppm)	J_{FH1}(Hz)	J_{FH2}(Hz)
(22)	74.11		0.72	
(25)	74.12			
(23)	74.14	67.56		2.34
(26)	68.37	67.88		1.47
	67.15	67.80		2.20

2.7 DISKUSSION DER ERGEBNISSE.

Für die am Seitenkettenstickstoff nicht oder nur einfach methylierten Indolamine bietet TFAA eine schnelle und reproduzierbare Derivatisierungsmöglichkeit durch Bildung einheitlicher Derivate. Sowohl aufgrund der kurzen Reaktionszeit von 10 Minuten bei 60°C als auch aufgrund der leichten Entfernbarkeit ist es MBTFA und TFAI überlegen. Für DMT und Bufotenin war TFAA jedoch nicht anwendbar.
Hier bietet MBTFA eine einigermaßen befriedigende Ausweichmöglichkeit.
Allerdings erwiesen sich beide Reagenzien nicht dafür geeignet, alle Indolamine gleichzeitig zu derivatisieren. Auf der Suche nach einer dementsprechenden Substanz bot sich TFAI als Lösung an, da hier tatsächlich eine Derivatisierung aller Indolamine zu einheitlichen Produkten unter gleichen Reaktionsbedingungen möglich war. Das Reagenz erwies sich aber für analytische Anforderungen als unbrauchbar:
Sowohl das überschüssige TFAI als auch das bei der Reaktion und durch Feuchtigkeit entstehende Imidazol störten im GC stark. Sie waren nicht abblasbar, andere Methoden zur Entfernung erwiesen sich als experimentell undurchführbar.
Ein geeignetes Reagenz zur Derivatisierung aller Indolamine steht nach wie vor aus. Nach den bisher gemachten Erfahrungen sollte diese Verbindung folgende Eigenschaften besitzen:

1) Hohe Reaktivität, damit kurze Reaktionszeiten unter milden Bedingungen.
2) Bei der Reaktion darf keine Säure entstehen.

3) Hohe Flüchtigkeit, damit leicht abblasbar.

Keine Probleme ergaben sich bei der Frage nach dem chromatographischen Verhalten der Trifluoracetylderivate. Auf der mit unpolarem OV 101 belegten Säule a) konnte eine eindeutige Trennung erzielt werden. Versuche zur Erfassungsgrenze brachten ebenfalls befriedigende Ergebnisse. Schon bei Verwendung eines FID konnten nach Derivatisierung von 300-400 ng der Ausgangssubstanzen die Signale der entsprechenden Derivate leicht identifiziert werden. Dabei genügten 0.3 µl Einspritzmenge aus einer Lösung von etwa 20 µl Essigsäureethylester bei einer Splitrate von 1:40.

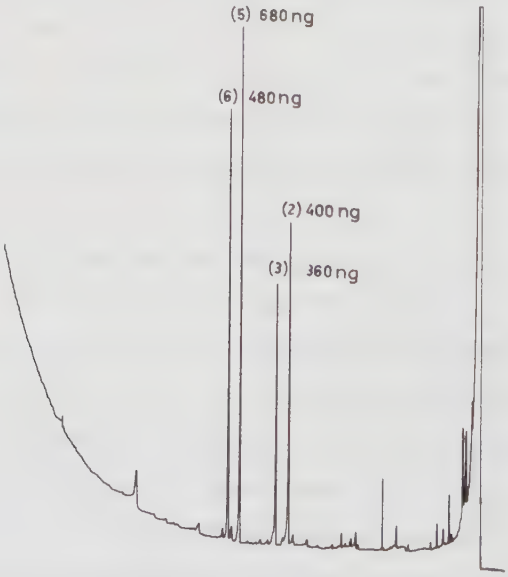


Abb. 57: GC von Indolaminen, mit TFAA derivatisiert.
Säule a), IT 300°C, 100-300°C, Heizrate 8°/Min.

3. AUFARBEITUNG DES HARNS.

3.1 ALLGEMEINE BEMERKUNGEN.

Innerhalb eines Tages scheidet ein Erwachsener ca. 1000-1500 ml Urin aus. In dieser Probenmenge sind etwa 25 g anorganische Salze sowie 35 g organische Stoffe, davon allein etwa 30 g Harnstoff, enthalten.[116] Die gesuchten Indolamine befinden sich darin vermutlich in Konzentrationen von 1 µg und darunter, also im ppm-Bereich.

Aus diesen Angaben ist sofort ersichtlich, daß eine direkte Bestimmung aus dem Harn wegen der Probenkomplexität unmöglich ist. Aus diesem Grund stellen Vortrennung und Anreicherung einen wesentlichen Schritt in der organischen Spurenanalyse dar.

Die Probenaufarbeitung verfolgt das Ziel, störende Begleitkomponenten, vor allem Verbindungen, welche im Harn in höheren Konzentrationen vorhanden sind (Harnstoff, Kreatinin usw.), möglichst vollständig abzutrennen und die Probe soweit aufzukonzentrieren, daß eine Detektion der gesuchten Substanzen möglich ist.

Folgende Kriterien sind für die Aufarbeitung biologischer Proben grundlegend und wichtig:

1) Selektive Abtrennung der gesuchten Verbindungen aus dem Harn.
2) Möglichst quantitative Erfassung der Substanzen mit hoher Wiederfindungsrate in jedem Trennschritt.
3) Möglichst wenig Vortrennungsschritte, da jeder Arbeitsgang mit unwiederbringlichen Verlusten verbunden ist und Zeit kostet.
4) Das Verfahren soll einfach und reproduzierbar sein.

5) Zersetzung oder Artefaktbildung der Verbindungen ist zu vermeiden.

Die Vielzahl der Publikationen auf diesem Gebiet zeigt, daß es zahlreiche Möglichkeiten zur selektiven Abtrennung basischer Verbindungen aus dem Harn gibt. Sie zeigt gleichzeitig, daß es keinen "Standardaufarbeitungsgang" für alle Problemstellungen gibt, sondern daß vielmehr die Probenvorbereitung ganz speziell auf die gesuchten Verbindungen abgestimmt werden muß.
In der folgenden Tabelle sind einige gängige Trennmethoden und die dazugehörigen Kriterien der Trennwirkung zusammengestellt.

Tabelle 9: Trennmethoden und Trennwirkung.

Methode	Kriterium der Trennwirkung
Fl./Fl.-Extrakt.	Auftrennung saurer, neutraler, basischer Verb.
Extrelut	je nach pH-Wert. Polarität der Substanz.
Ionentauscher	Auftrennung saurer, basischer Verb. je nach pH-Wert u. Art des Ionentauschers
XAD, Sephadex	Abtrennung aromatischer u. unpolarer Verb.
Kieselgel, RP, Cellulose, Al_2O_3 LC oder DC	Polarität, substanzspezifische Faktoren.

Im folgenden werden verschiedene Vortrennungsverfahren, welche im Hinblick auf ihre Eignung zur Isolierung von Indolaminen aus dem Harn näher untersucht wurden, diskutiert.

3.2 HYDROLYSE DER AMINKONJUGATE.

Im Harn liegen Amine sowohl in freier als auch in gebundener Form vor. Einige Amine werden sogar zu 80-90 % als Konjugate ausgeschieden.[117,118] Da in dieser Arbeit keine getrennte Untersuchung freier und gebundener Amine angestrebt wurde, war eine Konjugatspaltung vor Beginn der eigentlichen Aufarbeitung erforderlich, da gebundene Amine andere chemische und physikalische Eigenschaften besitzen als in freier Form vorliegende.
Diese Konjugatspaltung wurde im siedenden Wasserbad bei pH 1 durchgeführt. Nach [119] sollte dabei eine Reaktionszeit von 20 Minuten ausreichen. Dabei färbte sich der Urin zunehmend dunkelbraun durch Freisetzung von Farbpigmenten, welche im weiteren Analysengang immer wieder auftauchten.
Nach Abkühlen des Urins und Einstellen auf pH 10-11 trat eine deutliche Trübung auf, sodaß eine Filtration notwendig wurde.

3.3 IONENAUSTAUSCHCHROMATOGRAPHIE.

Die Adsorption von Aminen und anderen Basen an sauren Ionentauschern beruht prinzipiell auf der elektrostatischen Wechselwirkung zwischen der protonierten Base und den anionischen

Gruppen, welche mit der festen Matrix des Ionentauschers, Polymeren auf Styrolbasis, Divinylbenzol und anderen Polymerbildnern, verknüpft sind.

Während starke Basen bereits mit schwachsauren Kationentauschern, Carboxylgruppen enthaltend, gebunden werden, gelingt die Adsorption schwacher Basen gewöhnlich nur mit stark sauren Ionentauschern, welche Sulfonsäuregruppen enthalten.

Das Sorptionsverhalten von Basen wird allerdings außerdem durch nichtelektrostatische Vorgänge beeinflußt. So treten z.B. aromatische Amine mit dem Kunstharzgerüst von Dowex Ionentauschern in Wechselwirkung. Auch sterische Effekte können eine Rolle dabei spielen.[120] Ionenaustauschchromatographie wird normalerweise in wässrigen Systemen betrieben, da die Verwendung organischer Lösungsmittel wegen unzureichender pH-Kontrolle bei der Untersuchung biologischer Gemische keine praktische Anwendung fand.

Da bei Stickstoffbasen der pH-Wert in der Umgebung der Säuregruppe das Ausmaß der Wechselwirkung bestimmt, ist die Wahl des Fließmittels sowohl für die Adsorption als auch für die Desorption ausschlaggebend. Wichtig ist, daß der Ionentauscher und die Auftragslösung denselben pH-Wert besitzen, da dann der Adsorptionsvorgang ohne pH-Änderung abläuft und damit reproduzierbare Bedingungen gewährleistet sind.

Einige ausführliche Übersichtsartikel vermitteln theoretische Grundlagen und praktische Anwendungsbeispiele zu diesem Gebiet.[121-126] Zur vollständigen Desorption der Basen sollte es genügen, den Puffer mit wässriger saurer oder alkalischer Lösung zu durch-

brechen oder mit Hilfe eines Pufferelutionsgradienten eine fraktionierte Desorption durchzuführen. Damit wäre eine selektive Abtrennung von Indolaminen und ähnlich starken Basen gewährleistet.

Mehrere Autoren berichten über die erfolgreiche Anwendung von Ionentauschern bei der Analyse biogener Amine, vor allem von Catecholaminen aus Urin.[127-134)]

Die durchweg stark basischen Indolamine sollten bereits durch schwach saure Ionentauscher genügend stark adsorbiert werden. Die Wahl fiel deshalb auf Amberlite IRC 50, einen schwach sauren Kationentauscher auf Polystyrolbasis. Er wurde sowohl in der H^+-Form als auch in der Na^+-Form verwendet. Wie sich später herausstellte, brachte dies in den Ergebnissen keinen erkennbaren Unterschied.

Untersucht wurden an diesem Ionentauscher die Retensionsvolumina von DMT und Tryptamin bei Anwendung verschiedener Puffersysteme als Fließmittel. Die Desorption der Indolamine wurde mit einem UV-Detektor verfolgt.

Tabelle 10: Retentionsvolumina mit Amberlite IRC 50.

Verbindung	Gegenion	Auftragsm.	Elution	Desorption
(2)	H^+	150ml, pH6	150ml H_2O, dann 5n HAc	350-600ml
(2)	H^+	150ml, pH5	150ml H_2O, dann 5n HAc	300-600ml
(2)	H^+	150ml, pH5	25ml H_2O, dann Gradient pH5-Puffer-5n HAc	350-600ml
(2)+(7)	H^+	1l, pH5	500ml pH5-Puffer, dann 7n HAc	1600-2600ml

(2)+(7)	Na^+	50ml, pH6.6	250ml H_2O, dann 0.1n HCl	275-700ml
(2)+(7)	Na^+	200ml, pH7	50ml H_2O, dann Gradient H_2O-5n HAc	500-800ml

Wie aus Tabelle 10 ersichtlich, war es durch geschickte Wahl der Elutionsbedingungen also durchaus möglich, basische Verbindungen selektiv abzutrennen. Dabei traten allerdings recht hohe Retentionsvolumina auf. Das Verfahren schien für diese Aufgabenstellung zu aufwendig, da ja immer nur ein kleiner Teil der Basenfraktion des Urins, nämlich die Indolamine, isoliert wurden. Ionenaustauschchromatographie ist vielmehr für "Screeninguntersuchungen" zu empfehlen, bei denen viele in ihren Eigenschaften verschiedene Amine isoliert werden.
Da in der Zwischenzeit durch Anwendung von XAD-Harzen und präp. DC geeignetere Verfahren gefunden worden waren, wurde in dieser Arbeit die Ionenaustauschchromatographie nicht weiter berücksichtigt.

3.4 VORTRENNUNG AN XAD-4 HARZ UND SEPHADEX.

XAD-Harze sind hochvernetzte Copolymere auf Polystyrol-Divinylbenzolbasis. Die Fähigkeit zur Adsorption organischer Verbindungen beruht auf den lipophilen Eigenschaften dieser Phase. Die Stärke der Adsorption hängt daher ebenfalls in hohem Maße von der Lipophilie der zu adsorbierenden Verbindung ab.[135-137)]

Besonders gut werden aromatische und unpolare Verbindungen zurückgehalten. Bei Anwesenheit von Hydroxi - oder Aminogruppen sinkt das Retentionsvolumen beträchtlich, ionische und polare Verbindungen zeigen keine bzw. wenig Adsorptionsverhalten. Die Stärke der Adsorption von Phenolen und Aminen ist daher pH-abhängig.

Die XAD-Harze finden breite Anwendung in der organischen Analytik. So wird in einigen Veröffentlichungen über dessen Anwendung bei der Abtrennung von basischen Arzneimitteln aus Blut und Urin berichtet.[138,139] Ähnliches Verhalten zeigt das Dextrangel Sephadex, ein Polymer auf Zuckerbasis.[140,141] Es wurde u. a. zur Vortrennung beim gaschromatographischen Nachweis von Catecholaminen,[142] sowie von 5-Hydroxiindolmetaboliten [143] verwendet. Beide Systeme lassen sich in wässrigen Fließmitteln verwenden, Urin oder Blut sind also direkt einsetzbar. Die Bedeutung im Hinblick auf die hier zugrunde liegende Problemstellung liegt vor allem in der Tatsache, daß anorganische Salze sowie in hohen Konzentrationen vorliegende Substanzen wie Harnstoff und Kreatinin praktisch nicht adsorbiert werden und damit bequem abgetrennt werden können, während die aromatischen Indolamine gut adsorbiert werden sollten.

Schon nach wenigen Vorversuchen zeigte sich die Überlegenheit von XAD-4 gegenüber Sephadex. Dies hat folgende Gründe:

- Sephadex quillt in Wasser auf das anderthalbfache seines Trockenvolumens. Beim Wechsel des Fließmittels können weitere Volumenänderungen eintreten.
- Die sehr feine Körnung auch des gröbsten Sephadexgels erlaubt im Gegensatz zu XAD-4 nur sehr kleine Fließmittelgeschwindig-

keiten mit großer Verstopfungsgefahr.

- Sephadex ist viel weniger haltbar als das vergleichsweise robuste XAD-4.

Aufgrund der daraus resultierenden besseren experimentellen Handhabung wurde im folgenden nur noch XAD-4 Harz verwendet.

Es erwies sich als notwendig, neues Harz mit Aceton und Dichlormethan im Soxlethapparat vorzureinigen, da sonst beim späteren Eluieren die Verunreinigungen mitgeluiert wurden. Auf dieselbe Weise wurde verbrauchtes Harz regeneriert.

Um optimale Adsorption zu erzielen, wurde das Harz mit Pufferlösung auf den pH-Wert des Urins eingestellt. Als Puffersysteme dienten dabei Glycin/Natronlauge/Natriumchlorid (pH 11) und Essigsäure/Natriumacetat (pH 7-9).

Dazu wurde verbrauchtes XAD-4 mit Wasser gewaschen, im Puffer aufgenommen und eine halbe Stunde unter gelegentlichem Umschütteln im Wasserstrahlvakuum entgast, um Lösungsmittelreste zu entfernen.

Die Untersuchung der Adsorptions - und Desorptionseigenschaften wurden mit Tryptamin und DMT mit Hilfe eines UV-Detektors durchgeführt. Zu den wässrigen Lösungen der beiden Indolamine wurden Kochsalz und Harnstoff in urinähnlicher Konzentration zugegeben. Mit salpetersaurer Silbernitratlösung wurde Salzfreiheit, mit FCNP-Reagenz wurde Harnstofffreiheit überprüft.

Der pH-Wert beim Adsorptionsvorgang wurde auf 10-11 eingestellt, da hier phenolische Komponenten und Aminosäuren ionisch vorliegen und schlechter adsorbiert werden. Auf diese Weise sollte ein Großteil dieser Verbindungen abgetrennt werden.

Aus den Versuchen ergab sich, daß sowohl DMT als auch Tryptamin

unter diesen Bedingungen sehr stark adsorbiert werden, während Harnstoff und anorganische Salze beim Nachwaschen mit dest. Wasser quantitativ eluiert werden. Die Indolamine wurden sogar so stark festgehalten, daß eine alleinige Änderung des pH-Wertes auf 1-2 keine Desorption bewirkte. Erst der Einsatz organischer Lösungsmittel brachte diesen Effekt. Als wirksamstes Elutionsgemisch ergab sich CH_2Cl_2/Methanol/Eisessig 5:4:1.

Während anfangs ausschließlich das Säulenverfahren angewendet wurde, erwies es sich als experimentell einfacher, nach dem "Batchverfahren" zu arbeiten: XAD-4 wurde mit gleicher Vorbehandlung zur entsprechenden Menge Urin gegeben und nach einiger Zeit über eine kurze Säule abgesaugt, mit Wasser gewaschen und dann wie üblich eluiert. Nach und nach kam es zu einer Standardisierung dieses Vortrennungsschrittes:

20 g mit pH 11 Puffer vorbehandeltes XAD-4 Harz wurde abgesaugt und zu 500 ml Urin gegeben, der zuvor ebenfalls auf pH 11 gebracht worden war. Diese Mischung wurde 20 Minuten unter gelegentlichem Umschütteln stehengelassen. Anschließend wurde das Harz über eine Säule im Wasserstrahlvakuum abgesaugt und mit 200 ml dest. Wasser gewaschen.

Nach 5-10 - minütigem Trockensaugen wurde die Vakuumpumpe entfernt und mit 70 ml CH_2Cl_2/Methanol/Eisessig 5:4:1 eluiert. Dabei hellte sich das vormals dunkelbraun gefärbte XAD-Harz sichtbar auf.

Der am Rot.-Verdampfer eingeengte Rückstand des Eluats wog weniger als 300 µg und war salzfrei sowie harnstofffrei.

3.5 FLÜSSIG/FLÜSSIG-EXTRAKTION.

Als experimentell einfaches und schnelles Vortrennungsverfahren bietet sich die Flüssig/Flüssig-Verteilung an. Sie ist nach wie vor die Methode der Wahl bei den meisten Aufarbeitungsgängen zur Analyse organischer Verbindungen aus wässrigen Proben.[144] Entscheidender Punkt ist hier die Lage des Verteilungsgleichgewichtes eines Stoffes zwischen wässriger und organischer Phase. Dieses Gleichgewicht hängt in erster Linie von der Polarität der Verbindung ab. Da bei Anwesenheit von Hydroxi- und Aminogruppen im Molekül die Polarität hinwiederum vom pH-Wert abhängt, sollte eine Anreicherung von Indolaminen ohne Hydroxigruppe auf folgende Weise möglich sein:

1) Extraktion bei pH 1-2. Dabei gehen neutrale und saure Verbindungen mehr oder weniger in die org. Phase. Die Indolamine liegen bei diesem pH-Wert als Salze vor und verbleiben in der wässrigen Phase.
2) Einstellen des Urins auf pH 9-12 und mehrmalige Extraktion. Dabei geht die Basenfraktion des Harns, vor allem die lipophilen Komponenten, in die org. Phase.

Zur Optimierung dieses Vortrennungsschrittes mußten zunächst zwei Parameter genauer untersucht werden, nämlich der pH-Wert und der Einfluß des verwendeten Lösungsmittels.

Tabelle 11: Extraktionsausbeute bei einmaliger Extraktion.

Verbindung	org. Phase	pH	(%) in org. Phase
DMT	1-Butanol	1.5	6.5
	i-Amylalkohol	1.5	6.5
	1-Butanol	3.2	40
	i-Amylalkohol	3.2	40
	CH_2Cl_2	3.1	6
	CH_2Cl_2	7.5	27
	CH_2Cl_2	9.0	29
	CH_2Cl_2	10.8	76
	CH_2Cl_2	11.8	93
Tryptamin	CH_2Cl_2	10.9	53
	CH_2Cl_2	11.9	73
	CH_2Cl_2	12.6	73
	Essigester	11.8	72
	T.-But.meth.ether	10.8	53
	T.-But.meth.ether	12.1	69
Bufotenin	Essigester	8.7	20
	Essigester	10.4	51
	Essigester	11.3	82

Diese Werte lassen sich wie folgt interpretieren:

1) Zur Extraktion der Indolamine aus Urin liegt der optimale pH-Wert zwischen 11 und 12.

2) Bei Verwendung der gängigen unpolaren Lösungsmittel wie Ether, Dichlormethan, Essigester ist das Extraktionsgleichgewicht weitgehend unabhängig von der org. Phase.

3) Bei Extraktionen im sauren Bereich mit höheren Alkoholen wie 1-Butanol und i-Amylalkohol zur Vorreinigung muß ein pH-Wert von 1 eingehalten werden, da sonst zu große Mengen an Indolaminen in die org. Phase gelangen.
4) Bemerkenswert ist, daß auch Bufotenin bei pH 11 zum Großteil in die org. Phase geht.

Von den untersuchten Lösungsmitteln findet Essigester in der analytischen Chemie die meiste Anwendung. Er besitzt folgende Vorteile:

- Geringe Neigung zur Emulsionsbildung.
- Er bildet mit Wasser ein Azeotrop, welches mit einem Essigestergehalt von 85-92 % übergeht.[145] Feuchtigkeitsspuren sind also leicht durch Abblasen bzw. Einrotieren entfernbar.
- Relativ leicht in reiner Form erhältlich.

Es lag nahe, als ersten Reinigungsschritt eine Flüssig/Flüssig-Extraktion vorzunehmen. Dies erwies sich jedoch als experimentell ungünstig, da immer starke Emulsionsbildung sowohl im alkalischen als auch im sauren Milieu auftrat, welche die Aufarbeitung verzögerte. Ein weiterer Nachteil lag in dem hohen Lösungsmittelverbrauch. Immerhin konnte durch saure und anschließend basische Extraktion von 600 ml Harn mit Essigester eine Reduktion der festen Rückstände auf ca. 0.5 g erreicht werden, was einer enormen Anreicherung entspricht und die Leistungsfähigkeit dieser einfachen Methode zeigt.

Die oben erwähnte Emulsionsbildung trat nicht auf, wenn als erster Schritt eine XAD-4 Vortrennung stattgefunden hatte. Aus

diesem Grund wurde die Flüssig/Flüssig-Extraktion als zweiter Schritt eingebaut, womit gleichzeitig das benötigte Lösungsmittelvolumen stark reduziert werden konnte.

Dazu wurde der Rückstand der XAD-Trennung in 25 ml 0.1 n NaOH aufgenommen und dreimal mit je 25 ml Essigester extrahiert. Die vereinigten Extrakte, welche die gesuchten Verbindungen enthielten, wurden auf etwa 10-15 ml eingeengt und mit 3 ml o.1 n HCl rückextrahiert. Durch diesen Schritt wurde gleichzeitig eine Volumenreduzierung erreicht, sodaß die weiteren Extraktionsgänge im Zentrifugenglas durchgeführt werden konnten. Hierbei wurden 10 ml Zentrifugengläser mit NS 14.5 Schliff verwendet, Zeit- und Substanzverluste wurden auf diese Weise vermieden.

Die salzsaure wässrige Lösung wurde nun mit 3 ml i-Amylalkohol ausgeschüttelt. Dabei ging ein Großteil der farbigen Verunreinigungen in die org. Phase, die wässrige Phase hellte stark auf und war nur noch schwach gelb gefärbt. Diese farbigen Substanzen müssen polare Gruppen enthalten, da der oben beschriebene Effekt mit Essigester kaum, mit CH_2Cl_2 und Toluol überhaupt nicht beobachtet werden konnte.

Nach dieser weiteren Reinigung wurde nun endgültig mit Essigester extrahiert, nachdem die Wasserphase mit 10 n NaOH auf pH 12 gebracht worden war. Der daraus erhaltene, auf etwa 100 µl eingeengte Extrakt war praktisch farblos und sollte die Indolamine enthalten. Bei der Derivatisierung und gaschromatographischen Analyse stellte sich jedoch heraus, daß der Untergrund für die Anforderungen einer Spurenanalyse noch zu hoch war. Es mußte also noch ein weiterer Vortrennungsschritt eingebaut werden.

Unabhängig davon wurde die Möglichkeit untersucht, Indolamine durch Ionenpaarextraktion mit Pikrinsäure in die organische Phase zu überführen. Diese Methode findet vor allem bei der Extraktion von tetrasubstituierten Ammoniumverbindungen Anwendung.
Zur Untersuchung des Verteilungsgleichgewichtes wurde die wässrige Pikrinsäurelösung auf den gewünschten pH-Wert eingestellt. Die Konzentration des darin enthaltenen Indolamins wurde vor und nach Extraktion mit der org. Phase kolorimetrisch bestimmt. Da Pikrinsäure mit einem pKs von 0.38 bei allen Versuchen als Anion vorliegen mußte, konnte die geringere Farbintensität nur von in die org. Phase abgewanderten Ionenpaaren herrühren.

Tabelle 12: Extraktionsausbeute bei einmaliger Extraktion.

Verbindung	org. Phase	pH	(%) in der org. Phase
Tryptamin	CH_2Cl_2(H_2O-ges.)	8.5	0
	"	2.9	22
	"	2.65	44
	"	2.3	83
	"	2.0	81
	"	2.0	62 halbes Vol. CH_2Cl_2
	"	2.0	91 dopp. Vol. CH_2Cl_2
DMT	"	2.8	40
	"	2.3	82

3.6 PRÄPARATIVE DÜNNSCHICHTCHROMATOGRAPHIE.

Wie bereits anfangs erwähnt, finden dünnschichtchromatographische Methoden eine große Anwendungsbreite beim Nachweis biogener Amine aus biologischen Flüssigkeiten. Vor allem vor dem Durchbruch von GC und HPLC war Dünnschichtchromatographie der letzte Trennungsschritt des Analysengangs. Die nachzuweisenden Substanzen wurden direkt auf der Platte durch Farbreaktionen und andere Detektionsmethoden anhand ihrer R_f-Werte identifiziert.

Es lag deshalb nahe, als dritten Reinigungsschritt präparative DC einzusetzen. Zwei Eigenschaften sprechen für diese Methode:

a) Sie besitzt höhere Trennleistung als das entsprechende säulenchromatographische Verfahren.

b) Sie ist experimentell bequemer durchzuführen als Säulenchromatographie.

Da in der Literatur vor allem Cellulose und Kieselgel als Trennschichten beschrieben sind, wurden die Trenneffekte dieser beiden Phasen mit unterschiedlichen Fließmitteln näher untersucht. Aufgetragen wurden jeweils verschiedene Indolamine sowie der Essigesterextrakt einer nach der beschriebenen Methode durchgeführten Urinaufarbeitung. Die DC-Platten wurden ohne Vorbehandlung eingesetzt.

Tabelle 13: Laufverhalten auf Cellulose F, 0.1 mm. Angegeben sind die R_f-Werte.

Fließmittel	(7)	(3)	(2)	(8)	(6)	(5)	(4)	Urinextrakt
Essigester	0	0	0	0	0	0	0	0
T.-But.methyl-ester	0	0	0	0	0	0	0	0
Ethanol	0.43	0.27	0.20	0.53	0.36	0.16		0 - 0.6
EtOH/5nHAc 9:1	0.59	0.59	0.53	0.53	0.53	0.43	0.54	0 - 0.9
BuOH/5nHAc 1:1	0.75	0.75	0.72	0.70	0.70	0.68	0.73	0.26 - 1
pH5-Puffer	0.59	0.55	0.55	0.55	0.55	0.42		
pH7-Puffer	0.63	0.63	0.60	0.56	0.56	0.47		

Tabelle 14: Laufverhalten auf Kieselgel 60, 0.1 mm. Angegeben sind die R_f-Werte.

Fließmittel	(7)	(3)	(2)	(8)	(6)	(5)	(4)	Urinextrakt
$CHCl_3$/HAc 95:5	0	0	0	0	0	0	0	0 - 0.33
CH_2Cl_2/EtOH/ Essigester 8:1:1	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0 - 0.80
Ethanol	0.07	0.07	0.10	0.07	0.10	0.07	0.07	0.074
Methanol	0.19		0.07	0.17		0.07	0.07	0.6 - 0.95
CH_2Cl_2/MeOH 1:1	0.15	0.15	0.15	0.10	0.15	0.10	0.10	0.64 - 0.93
MeOH/NH_3 7:3	0.85		0.83	0.86		0.80	0.78	0.81 - 1
MeOH/NH_3 1:1	0.86		0.85	0.87		0.85	0.79	0.87 - 1
MeOH/NH_3 3:7	0.78		0.78	0.78		0.83	0.78	0.95
MeOH/NH_3/ Essigester 1:1:3	0.95		0.85	0.95		0.82	0.87	0.95

Die Tabellen zeigen, daß besonders Kieselgel zum Auftrennen des Urinextraktes geeignet ist. Mit Methanol als Fließmittel bleiben die Indolamine bei einem R_f-Wert zwischen 0.07 und 0.2 stehen, während der Hauptteil der Verunreinigungen einen R_f-Wert zwischen 0.6 und 0.95 zeigt. Damit sollte eine ausreichende Abtrennung möglich sein.

Damit die Indolamine möglichst quantitativ von der Kieselgelschicht desorbiert werden, erfolgte dieser Schritt mit einem Lösungsmittelgemisch, mit welchem die Indolamine hohe R_f-Werte aufweisen. Das war mit Methanol/25 % Ammoniak der Fall.

Der gesamte Aufarbeitungsschritt sieht demnach folgendermaßen aus: Der Urinextrakt mit einem Volumen von 150 µl wurde auf einer 0.25 mm dicken Kieselgelplatte maschinell bandförmig aufgetragen und mit Methanol als Fließmittel in einer gesättigten Kammer entwickelt. Nach Trocknen der Platte wurde die Schicht im Bereich R_f 0 - 0.25 umrandet und nach Besprühen mit Wasser abgekratzt. Dieses Anfeuchten erfolgte, um ein Absplittern und Wegfliegen der Kieselgelteilchen zu verhindern. Die abgeschabte Schicht wurde in ein Zentrifugenglas gefüllt und mit 3 ml Methanol/Ammoniak 9:1 versetzt. Nach zweiminütigem Vortexschütteln und anschließendem Zentrifugieren wurde der Überstand abpipettiert und zur Trockne einrotiert. Der Rückstand enthielt noch Kieselgelpartikel, welche durch Aufnehmen in Essigester und nochmaliges Zentrifugieren entfernt wurden.

Der so erhaltene Extrakt war nun nach Abblasen bereit zum Derivatisieren.

3.7 FLIESSDIAGRAMM DER URINAUFARBEITUNG.

Aus den durchgeführten Versuchen kristallisierte sich schließlich ein standardisierter Aufarbeitungsgang heraus, welcher zur Isolierung von Indolaminen aus dem Urin, vor allem DMT, NMT, Tryptamin, 1-Methyltryptamin und den entsprechenden 5-Methoxiderivaten geeignet schien:

500 ml Urin

↓

Mit konz. HCl auf pH 1 bringen, 20 Minuten bei 100°C verseifen.

↓

Auf pH 10 - 11 bringen, filtrieren.

↓

Adsorption an 20 g XAD-4 Harz im Batchverfahren, Waschen mit 200 ml Wasser, Elution mit 70 ml CH_2Cl_2/Methanol/Eisessig 5:4:1.

↓

Einrotierten Rückstand in 25 ml 0.1n NaOH aufnehmen, dreimalige Extraktion mit je 25 ml Essigester.

↓

Rückextraktion des eingeengten Extraktes mit 3 ml 0.1n HCl.

↓

Ausschütteln der wässrigen Phase mit 2 ml i-Amylalkohol.

↓

Wässrige Phase auf pH 11 bringen, dreimal mit je 3 ml Essigester extrahieren.

↓

Extrakt auf 100 µl einengen, auf DC - Kieselgelplatte o.25 mm auftragen, mit Methanol entwickeln.

|

R_f 0 - 0.25 abkratzen und mit Methanol/Ammoniak 9:1 eluieren.

|

Abblasen, Derivatisierung, GC-Analyse.

Durch die Kombination XAD-4 - Flüssig/Flüssig-Extraktion wird erreicht, daß im ersten Schritt alle aromatischen und unpolaren Verbindungen isoliert werden, im zweiten Schritt aus dieser Fraktion alle basischen Substanzen abgetrennt werden. Es liegen dann hauptsächlich nur noch basische, aromatische und unpolare Verbindungen vor. Deren Feinauftrennung geschieht dann durch präp. DC. Durch das Vorschalten der XAD-Harzabtrennung wird eine experimentelle Vereinfachung der Aufarbeitung erreicht, da hier schon störende Begleitkomponenten wie Salze, Harnstoff, aber auch Peptide und ähnliche Substanzen, welche später bei der Extraktion Anlaß zur Emulsionsbildung geben, entfernt werden.
Der gesamte Zeitaufwand für eine Analyse beträgt 2 -3 Stunden.

4. NACHWEIS VON INDOLAMINEN AUS DEM HARN.

Der oben diskutierte Analysengang soll als prinzipielle Möglichkeit des Nachweises von Indolaminen aus Urinproben verstanden werden. Er bildet ein grundlegendes Schema, welches durch kleine Variationen der Bedingungen noch verfeinert und auf spezielle Belange abgestimmt werden kann. Mit Hilfe dieses Verfahrens sollte es grundsätzlich möglich sein, verschiedene Indolamine nach Derivatisieren aus dem Harn nachzuweisen.

Wie bereits bei der Untersuchung der Derivatisierungsmethoden erwähnt, war es nicht möglich, alle Indolamine unter gleichen Bedingungen in die Trifluoracetylderivate zu überführen. Die Leistungsfähigkeit des Analysenganges mußte also bei den N,N-dimethylierten und den übrigen Indolaminen getrennt getestet werden.

Dazu wurden zu 500 ml Urin gesunder Kontrollpersonen bekannte Mengen der betreffenden Indolamine zugegeben. Die Harnprobe wurde dann auf die oben beschriebene Weise aufgearbeitet, mit dem geeigneten Reagenz derivatisiert und der Extrakt im Kapillar-GC untersucht. Die Signale der gesuchten Verbindungen wurden durch Zugabe des entsprechenden Trifluoracetylderivates zur einspritzbereiten Probe und Vergleich der Chromatogramme sowie anhand der Retensionszeiten identifiziert.

Die Proben wurden jeweils mit FID und ECD untersucht. Hier zeigte sich der große Vorteil des ECD für trifluoracetylierte Verbindungen: Während der FID bei etwa 1 µg/500 ml Urin bei allen Verbindungen an der Grenze seiner Möglichkeiten angelangt war, konnten diese Mengen im ECD noch mühelos erfaßt werden, hier war sogar

eine Verdünnung des Extraktes notwendig.

Die folgenden Chromatogramme zeigen das Resultat bei Zugabe von 1 µg NMT zu 500 ml Harn. Tryptamin wurde nicht zugegeben, da es im Urin immer in Konzentrationen von 50 - 100 µg/l vorhanden ist.

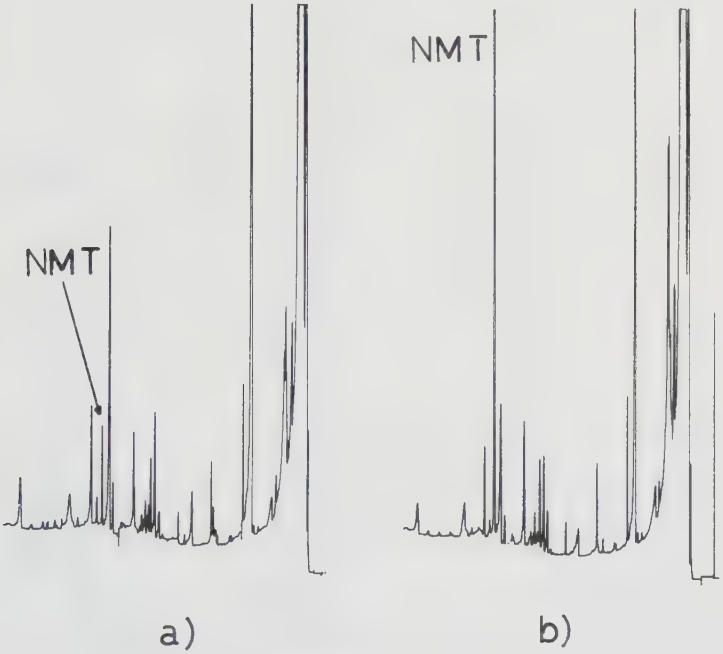
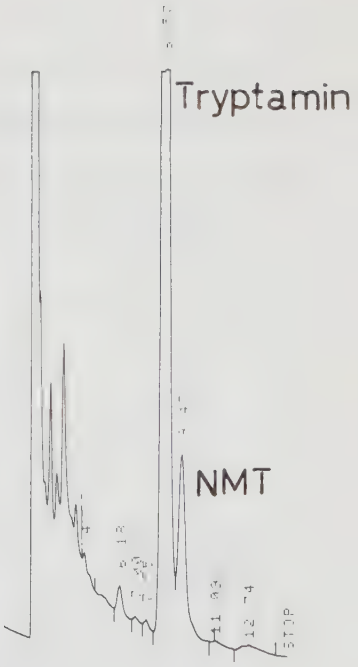


Abb. 58: GC des Urinextraktes nach Derivatisierung mit TFAA.
a) ohne Zumischen, b) Nach Zugabe von (26).
Detektor: FID.
Säule a) , IT = 300°C, 100-300°C, Heizrate 8°/Min.

Abb. 59: GC desselben Extraktes
bei Verwendung eines
ECD.
Säule b), IT= 300°C, 220°C iso



Die Derivatisierung mit TFAA erwies sich einmal mehr als bequeme und zuverlässige Methode für die nicht N,N-dimethylierten Indolamine. Hier sollte eine Erfassungsgrenze von 10-50 ng/500ml Urin mit ECD erfassbar sein.

Schlechtere Ergebnisse lieferte die Analyse von DMT nach Derivatisierung mit MBTFA:

Im FID war 1 µg/500ml gerade noch nachweisbar. Zur Detektion im ECD mußte zuvor das MBTFA vollständig abgeblasen werden, was nur unter erheblichen Schwierigkeiten möglich war. Der Rückstand wurde in Essigester aufgenommen.

Hier konnte keine Steigerung der Empfindlichkeit wie bei NMT beobachtet werden. DMT war auch hier gerade noch nachweisbar. Möglicherweise lag dies an Verlusten beim Abblasen. Auf jeden Fall erscheint ein besseres Derivatisierungsmittel notwendig und wünschenswert.

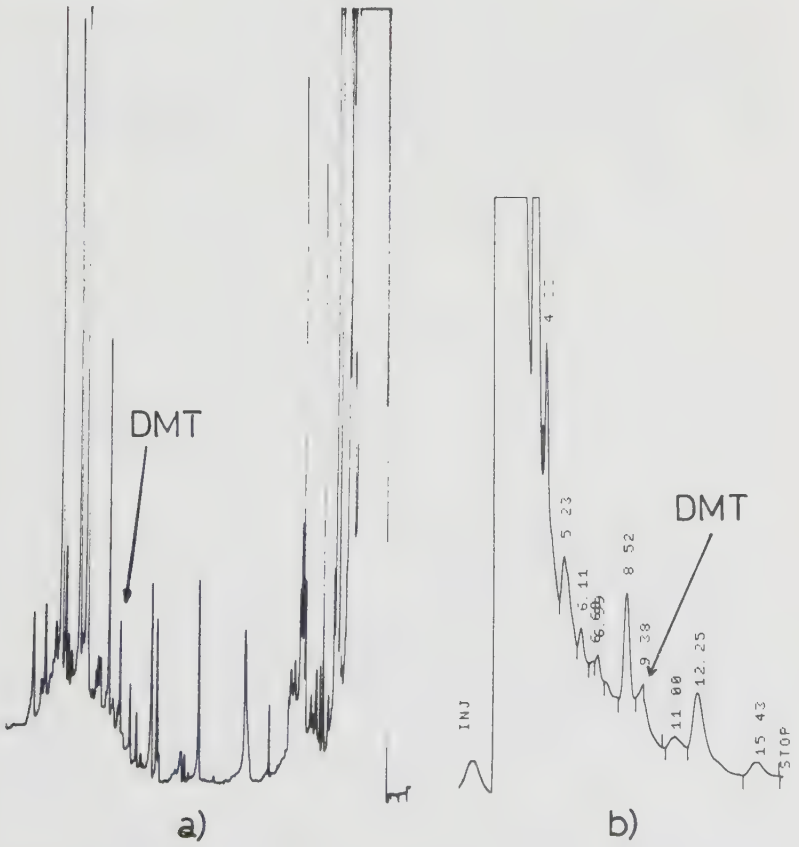


Abb. 60: GC der Aufarbeitung von 500 ml Urin, 1 µg DMT enthaltend.
a) FID , Säule a), IT= 300°C, 100-280°C, Heizrate 8°/Min.
b) ECD , Säule b), IT= 300°C, 220°C iso.

Die Ergebnisse lassen sich wie folgt zusammenfassen:
Der erarbeitete Trennungsgang eignet sich zur selektiven Abtrennung sämtlicher Indolamine ohne Hydroxigruppen. Die Verbindungen der Serotoninreihe sollten durch einfache Änderung von Bedingungen bei den einzelnen Aufarbeitungsschritten ebenfalls erfaßbar sein. Völlig zufriedenstellend verläuft der Nachweis der nicht N,N-dimethylierten Indolamine nach Derivatisieren mit TFAA.
Für die N,N-dimethylierten Verbindungen steht ein geeigneteres Reagenz als MBTFA noch aus. Die Nachweisempfindlichkeit läßt hier noch einiges zu wünschen übrig.

III. EXPERIMENTELLER TEIL.

1.ALLGEMEINES.

1.1 GERÄTE.

^{1}H-NMR, ^{13}C-NMR, ^{19}F-NMR (PFT-Spektren): WH 90, HFX 90 und WP 80 der Firma Bruker. Als interner Standard diente TMS, bei den ^{19}F-NMR-Spektren Trifluoressigsäuremethylester.

IR-Spektren: Spektrophotometer 281 der Firma Perkin Elmer.

Massenspektren: MAT 711 der Firma Varian.

GC/MS-Messungen: LKB 9000 Analyser Unit Gaschromatograph Mass Spectrometer.

Gaschromatographen: a) Modell Fractovap 2101 der Firma Carlo Erba mit Temperaturprogramm. Elektronischer Linienkompensationsschreiber Linecomb der Firma Hartmann und Braun. M 3 Integrator der Firma Perkin Elmer. b) Gaschromatograph 5710 der Firma Hewlett Packard. HP 3380 A Integrator mit Schreiber, HP 7671 A Automatic Sampler.

Säulen: a) Kapillarsäule OV 101, 25m, Trägergasdruck 0.45 kg/cm Wasserstoff. b) Gepackte Säule Gaschrom Q, belegt mit Trifluorpropylmethylsilicon, 10 Ft., 80-100 mesh. 30 ml/Min. Argon/Methan 95:5. C) Kapillarsäule CW 20 M, 25m, Phys. Bed. wie a).

UV-Photometer: PMQ II der Firma Zeiss.

Kolorimeter: "Spectronic 20" der Firma Bausch und Lomb.

UV-Detektor: Absorbance Monitor UA 5 der Firma ISCO.

Fraktionssammler: Modell 328 der Firma ISCO.

UV Lampe für DC: Universallampe der Firma Camag.

Zentrifuge: "Simplex" der Firma Heräus Christ.

PH-Meter: E 512 der Firma Metrohm.

Elementaranalysen: Elemental Analycer, Modell 1104 der Firma Carlo Erba.

Schmelzpunkte: Büchi Schmelzpunktsapparat nach Dr. Tottoli. Die Schmelzpunkte sind ebenso wie die Siedepunkte nicht korrigiert.

Molekulargewichtsbestimmung: Dampfdruckosmometer der Firma Knauer.

1.2 CHEMIKALIEN.

Neben den in der Chemikalienausgabe des chemischen Instituts erhältlichen Chemikalien wurden folgende Substanzen von den Firmen direkt bezogen:

i - Amylalkohol	Merck
Chloroform-d_1	Merck
1,4-Diazabicyclo(2.2.2)oktan	Merck
N,N-Dimethylcarbamoylchlorid	EGA
DMSO-d_6	Merck
Dichlormethan z. Rückstandsanalyse	Merck
DC Fertigplatten Kieselgel 0.25mm, 20x20 cm	Merck
40x80 mm	Merck
Cellulose F o.1mm, 20x10 cm	Merck
Essigsäureethylester z. Rückstandsanalyse	Merck
Ethanol abs. z. Analyse	Merck
Hexamethyldisilazan	EGA
3-Hydroxipyridin	EGA
Ionentauscher IRC 50	Merck
MBTFA	Merck
Methylbromid, Ampulle	Merck
Natrium, 45%ige Dispersion in Paraffin	Fluka
Dinatriumhydrogenphosphat	Riedel De Häen
Natriumhydroxid p.a.	Merck
Pikrinsäure p.a.	Merck
Pufferlösung pH 11	Riedel De Häen
Sephadex G 15 und G 20	Pharmacia

Tetramethylsilan	EGA
Tert.-Butylmethylether	Merck
TFAI	Serva
Trifluoressigsäure	RiedelDe Häen
TFAA	Merck
Trimethylchlorsilan	Bayer
Tryptamin	EGA
XAD-4 Harz	Serva

2. VERSUCHE ZU KAPITEL I.

2.1 UMSETZUNG VON PYRIDOSTIGMIN MIT NATRIUMBORHYDRID UNTER VERSCHIEDENEN BEDINGUNGEN.

Jeweils 1.8 mg (0.07 mol) Pyridostigmin in 1 ml Wasser wurden mit 0.1 n Natronlauge bzw. 1 n Essigsäure auf den gewünschten pH-Wert gebracht und mit 0.5 ml Tert.-Butylmethylether versetzt. Nach Zugabe von 10 mg $NaBH_4$ und zehnminütiger Reaktionszeit wurden 120 µg 2,2',6,6'-Tetramethylbiphenyl als Standard zugegeben und die etherische Phase jeweils dreimal pro Probe ins GC eingespritzt.
Bei den Versuchen in organischen Lösungsmitteln wurde dieselbe Menge Pyridostigmin in 1 ml der betreffenden org. Phase gelöst und 10 mg $NaBH_4$ zugegeben. Nach Beendigung der Reaktion wurde das Gemisch direkt eingespritzt.

2.2 DARSTELLUNG VON 1-METHYL-3-(N,N-DIMETHYLCARBAMOYL)-1,2,5,6-TETRAHYDROPYRIDIN (12).

4 g (0.15 mol) Pyridostigmin wurden in 25 ml Wasser gelöst und 2 g (0.5 mol) $NaBH_4$ auf einmal zugegeben. Nach fünfzehnminütigem Rühren wurde auf 50 ml Wasser verdünnt, mit 1 n Natronlauge der pH-Wert auf 12 eingestellt und viermal mit insgesamt 175 ml Ether extrahiert. Nach Trocknen über Na_2SO_4 wurde auf ca 25 ml eingeengt und 50 ml gesättigte etherische Pikrinsäurelösung zugegeben. Nach Absaugen des gelben Niederschlags wurde aus

Ethanol umkristallisiert.

Ausbeute: 2.6 g (42% d.Th.), Fp.=107.5°C.

Zur Zersetzung des Pikrats wurde in 15 ml o.1 n Natronlauge gelöst und viermal mit insgesamt 40 ml Ether extrahiert. Nach Trocknen über Na_2SO_4 wurde die Etherphase auf 10 ml eingeengt und über eine kurze Säule mit pulverisierter Aktivkohle geschickt. Dabei verschwand die von der Pikrinsäure herrührende gelbe Färbung und es entstand eine klare Lösung, welche im Vakuum vollständig vom Ether befreit wurde.

Farbloses Öl, Ausbeute: 1.5 g (72%d.Th.).

2.3 DARSTELLUNG DER NEBENPRODUKTE.

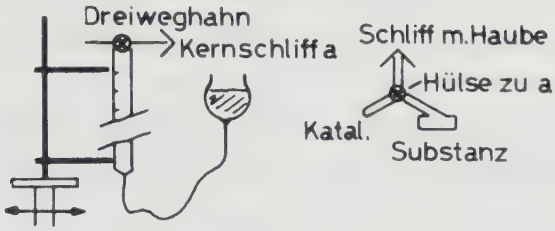
a) 2.5g (66 mmol) $NaBH_4$ in 50 ml Wasser wurden innerhalb von 10 Minuten zu 15 g (58 mmol) Pyridostigmin in 200 ml Wasser zugetropft, wobei die Temperatur auf 40° C anstieg. Nach weiteren 30 Minuten wurde viermalmit insgesamt 700 ml Ether extrahiert, über Na_2SO_4 getrocknet und der Ether am Rot.-Verdampfer völlig abgezogen.

Ausbeute: 6 g Reduktionsgemisch.

b) Das oben erhaltene Gemisch wurde in 30 ml 0.1 n Natronlauge gelöst und unter Rühren zwei Tage bei 120 ° C unter Rückfluß gekocht. Dabei trat eine immer stärker werdende Dunkelfärbung ein. Nach dreimaligem Extrahieren mit insgesamt 90 ml Ether und anschließendem Trocknen über Na_2SO_4 wurde der Ether auf ein Minimum eingeengt.

c) Zur Hydrierung der Nebenprodukte wurde eine Mikrohydrier-

apparatur (Eigenbau) verwendet.



In das kleine Rohr wurden 20 mg Palladium/Aktivkohle in Methanol, in den größeren Behälter 100 mg (0.5 mmol) Nebenprodukte in 5 ml Methanol gefüllt. Darauf wurde das Hydriergefäß kurz evakuiert und mit Wasserstoff gefüllt.

Dann wurde in die Bürette, deren Ausgleichsflüssigkeit am Anfang bis zum Hahn hochgestellt worden war, ebenfalls Wasserstoff eingeleitet und nach Vermischen der Komponenten im Hydriergefäß der Dreiweghahn geöffnet und die Schüttelvorrichtung eingeschaltet. Nach zehnminütiger Reaktionszeit, während der 10 ml Wasserstoff verbraucht wurden , wurde der Katalysator abfiltriert und das Methanol abgezogen.

2.4 DARSTELLUNG VON PYRIDOSTIGMIN.

a) 3-(N,N-Dimethylcarbamoyl)-oxipyridin.[146]

Zu 25 g (0.26 mol) 3-Hydroxipyridin, 30 g (0.3 mol) Triethylamin und 150 ml Toluol in einem 500 ml Dreihalskolben mit Rückflußkühler und Tropftrichter wurden innerhalb zehn Minuten 53 g (0.5 mol) N,N-Dimethylcarbamoylchlorid bei 80°C zugetropft.

Nach vier Stunden wurde auf Raumtemperatur abgekühlt, das entstandene Ammoniumsalz abfiltriert und das Toluol am Rot.-Verdampfer abgezogen. Danach wurde zweimal über eine Vigreuxkolonne (10cm) destilliert.
Farblose Flüssigkeit , $Kp._{0.2}$=120°C, Ausbeute: 20.6 g (47%d.Th.).
Reinheit nach GC: 99% .

b) Pyridostigmin[146]
8 g (48mmol) des in a) erhaltenen Produkts wurden in 25 ml Aceton gelöst und unter Eiskühlung (Rückflußkühler, Trockenrohr) 5.5 g (58mmol) Methylbromid auf einmal zugegeben. Nach zweitägigem Rühren bei Raumtemperatur wurde abgesaugt, mit Aceton gewaschen und das Produkt im Exsikkator über P_2O_5 getrocknet.
Weißes Pulver, Fp.=152-156°C, Ausbeute: 11.2 g (89%d.Th.).

2.5 DARSTELLUNG VON PYRIDOSTIGMINPIKRAT.

Zu 2 g (7.7mmol) Pyridostigmin in 60 ml Wasser wurden 3 g (13.1mmol) Pikrinsäure in 60 ml Wasser gegeben. Nach wenigen Sekunden entstand ein dicker gelber Niederschlag.
Ausbeute: 1.85 g (59%d.Th.).

2.6 AUFARBEITUNG DES SERUMS.

Zu 1 ml Blutserum (Poolserum) wurde 1 µg Pyridostigmin zugege-

ben. Diese Probe wurde mit 1 ml 0.1 n HCl versetzt, der entstandene Niederschlag 3 Minuten bei 4000 U/Min. abzentrifugiert, der Überstand abpipettiert. Der Rückstand wurde nochmals mit 0.5 ml 0.1 n HCl versetzt und die Prozedur wiederholt.
Die vereinigten Zentrifugate wurden mit 10 n Natronlauge auf pH 11 gebracht und 10 mg $NaBH_4$ zugegeben. Nach 20 Minuten Reaktionszeit bei Raumtemperatur unter gelegentlichem Umschütteln wurde dreimal mit je 2 ml Tert.-Butylmethylether extrahiert, die vereinigten Extrakte mit 1 ml 0.1 n HCl rückextrahiert. Die wässrige Phase wurde mit 10 n Natronlauge auf pH 11 eingestellt und dreimal mit je 1 ml Essigsäureethylester ausgeschüttelt. Nach Abblasen des Lösungsmittels auf 20 µl wurden 0.3 µl eingespritzt.

3. VERSUCHE ZU KAPITEL II.

3.1 DARSTELLUNG DER INDOLAMINE.

3.1.1 N,N-DIMETHYLTRYPTAMIN.

a) Oxalylchlorid.[147]

101.5 g (1.13mol) wasserfreie Oxalsäure wurde portionsweise zu einer eisgekühlten Lösung von 500 g (2.4mol) PCl_5 in 267.4 g $POCl_3$ als Lösungsmittel unter Rühren zugegeben. Die Mischung wurde weitere 18 Stunden gerührt, wobei sich das Eisbad langsam auf Raumtemperatur erwärmte. Nach Abfiltrieren des überschüssigen PCl_5 wurde die klare Lösung über eine 80 cm Füllkörperkolonne destilliert.

Wasserklare Flüssigkeit, $Kp._{760}$=67°C, Ausbeute: 98.6 g (68%d.Th.)

b) Indol-3-N,N-Dimethylglyoxylamid.[148,149]

Zu einer Lösung von 23.4 g (0.2mol) Indol in 300 ml abs. Ether wurden langsam 48 g (0.38mol) Oxalylchlorid unter Eiskühlung zugetropft. Nach zehn Minuten wurde der entstandene zitronengelbe Feststoff abgesaugt, mit wenig Ether gewaschen und in 300 ml abs. Ether suspendiert. In diese Suspension wurde ein schwacher Strom von Dimethylamin eingeleitet, bis die Farbe nach rein weiß umgeschlagen war. Nach weiterem zehnminütigem Rühren wurde abgesaugt, erst mit Ether, dann mit wenig Wasser zur Entfernung des Dimethylammoniumchlorids gewaschen und aus Ethanol und Ether umkristallisiert.

Weiße Nadeln, Fp.=152-154°C, Ausbeute: 28 g (65%d.Th.).

c) N,N-Dimethyltryptamin.[148)]

Zu einer Lösung von 25 g (0.66mol) $LiAlH_4$ in 600 ml abs. Ether wurde vorsichtig eine Suspension von 28 g (0.13mol) des in b) erhaltenen Produkts in 250 ml abs. heißem Benzol gegeben. Das Gemisch wurde zwei Stunden unter Rückfluß gerührt, danach abgekühlt, überschüssiges $LiAlH_4$ und der Reaktionskomplex mit Wasser vorsichtig hydrolysiert und der Feststoff abgesaugt. Nach Trocknen des Filtrats mit $MgSO_4$ wurde das Lösungsmittel vollständig abgezogen. Danach wurde über eine Vigreuxkolonne (10 cm) im Vakuum destilliert.
Weiße Kristalle, Fp.=45-47°C, $Kp.^{0.6}$=160°C, Ausbeute: 15.6 g (64%d.Th.).

3.1.2 1-METHYLTRYPTAMIN.[150)]

16 g (0.1mol) Tryptamin wurden in einer Mischung aus 250 ml trockenem Hexamethylphosphorsäuretriamid (HMPT) und 150 ml abs. THF gelöst und mit 16.8 g (0.15mol) Kaliumtertiärbutylat versetzt. Nach halbstündigem Rühren wurde die Lösung im Kryostaten auf -30°C abgekühlt und unter Rühren 14.6 g (0.1mol) Methyljodid als ca. 10 %ige Lösung in abs. THF zugetropft, daß die Innentemperatur nicht über -25°C stieg. Nach einer weiteren Stunde Rühren bei dieser Temperatur ließ man die Temperatur langsam auf -15°C ansteigen und schüttete die gesamte Lösung in 2 l Wasser. Nach fünfmaligem Extrahieren mit 300 ml Ether wurden die vereinigten

organischen Phasen zur Entfernung von HMPT-Resten dreimal mit wenig Wasser gewaschen, über $MgSO_4$ getrocknet und eingedampft. Der Rückstand wurde in 500 ml abs. Ether aufgenommen und bis zur vollständigen Fällung der Base mit ethanolischer HCl versetzt Nach Absaugen wurde aus Ethanol/Toluol umkristallisiert.
Weiße, watteartige Nadeln, Ausbeute: 10 g (48%d.Th.).

3.1.3 N-METHYLTRYPTAMIN.[151)]

4.2 g (21.4mmol) Tryptaminhydrochlorid wurden in eine Mischung von 200 ml Chloroform und 6.2 g (0.16mol) Natriumhydroxid in 200 ml Wasser eingebracht. Zur eisgekühlten Mischung im Erlenmeierkolben kamen unter Rühren 4.6 g (42.8mmol) Chlorameisensäureethylester. Nach einer Stunde wurde mit 6 n HCl angesäuert, eine halbe Stunde bei Raumtemperatur stehengelassen, dann die organische Phase abgetrenntund die wässrige Phase nochmal mit Chloroform extrahiert.
Die vereinigten org. Phasen wurden mit wenig Wasser gewaschen, über $MgSO_4$ getrocknet und Chloroform abrotiert. Das zurückbleibende ölige Carbamat wurde in 130 ml abs. THF zu einer siedenden Lösung von 10 g (0.26mol) $LiAlH_4$ in 130 ml abs. THF getropft. Nach eintägigem Kochen unter Rückfluß wurde die Reaktionsmischung vorsichtig hydrolysiert, abgesaugt und das Filtrat soweit wie möglich eingeengt. Der Rückstand wurde in 250 ml Ether aufgenommen, mit Wasser gewaschen und über $MgSO_4$ getrocknet. Das Produkt wurde aus Ether/n-Hexan umkristallisiert.
Weiße Kristalle, Fp.=83-84°C, Ausbeute: 2.5 g (67%d.Th.).

3.1.4 DARSTELLUNG DER PIKRATE.

0.2 g des betreffenden Indolamins wurden in 20 ml Ethanol gelöst. Dazu wurde unter Erhitzen eine konzentrierte Lösung von Pikrinsäure in Ethanol/Ether 1:1 im Überschuß zugegeben. Nach kurzem Aufkochen fiel das Pikrat bereits in der Hitze aus und konnte nach Abkühlen abgesaugt und aus Ethanol umkristallisiert werden.

Pikrat	Beschreibung	Fp.^{EtOH} (°C)
(7)	gelbe,pulvrige Kristalle	168-169
(2)	orangerote Plättchen	258 (Z.)
(4)	orangefarbenes Pulver	200-201
(3)	hellrote Nadeln	188-189
(5)	dunkelrote Nadeln	225-227
(8)	tiefgelbes Pulver	172-173

3.2 DARSTELLUNG DER DERIVATISIERUNGSREAGENZIEN.

3.2.1 TRIFLUORESSIGSÄUREANHYDRID (TFAA).[152]

Zu einem Teil TFAA wurden portionsweise bei 0°C 0.87 Teile P_2O_5 gegeben, wobei die Reaktionsmischung zu einer harten Masse wurde. Nach eintägigem Stehenlassen wurde über eine 60 cm Füllkörperkolonne destilliert.

Farblose Flüssigkeit, Kp.^{760}=39.5°C.

3.2.2 TRIFLUORACETYLIMIDAZOL (TFAI).[153-155]

Zu einer Lösung von 39.9 g (190mmol) TFAA in 50 ml abs. THF wurde unter Eiskühlung eine Lösung von 25.8 g (380mmol) Imidazol in 120 ml abs. THF getropft. Nach mehrstündigem Stehenlassen in der Kälte wurde das ausgefallene Imidazoliumtrifluoracetat abgetrennt, welches sich mit der entstandenen TFA bildet. Das Filtrat wurde vakuumdestilliert.
Farblose Flüssigkeit, $Kp._{14}$=45-46°C, Ausbeute: 14.4 g (70%d.Th.).

3.2.3 N-METHYLBISTRIFLUORACETAMID (MBTFA).

a) Trifluoressigsäureethylester.
Zu einer Mischung von 151 g (1.32mol) TFA und 70 g (1.52mol) abs. Ethanol wurden bei Raumtemperatur unter Rühren langsam 18.3 g Konz. Schwefelsäure zugegeben. Nach dem ersten Abklingen der Reaktion wurde unter Rückfluß auf 80°C erhitzt und diese Temperatur über Nacht gehalten.
Die org. Phase wurde abgetrennt, in Heptan aufgenommen, über Na_2SO_4 getrocknet und über eine 40 cm Füllkörperkolonne destilliert.
Farblose Flüssigkeit, $Kp._{760}$=59-63°C, Ausbeute: 115 g (61%d.Th.).

b) N-Methyltrifluoracetamid.[156]
100 g (0.7mol) Trifluoressigsäureethylester wurden in einem 250ml Dreihalskolben mit Intensivkühler, Trockenrohr und Einleitungsrohr vorgelegt und unter starkem Rühren auf o°C gekühlt.

25 g (0.81mol) Methylamin (Ampulle) wurden auf -10°C gekühlt, dann schnell aus dem Kühlbad genommen und mit dem Einleitungsrohr verbunden. Das Methylamin blubberte auf diese Weise langsam in den Kolben. Nach Beendigung der Zugabe wurde das Eisbad entfernt und 15 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Danach wurde über eine 10 cm Vigreuxkolonne destilliert.
Weiße Nadeln, $Kp.^{760}$=160°C, Ausbeute: 80.7 g (90%d.Th.).

c) N-Methyl-N-Trimethylsilyltrifluoracetamid.[157)]
Zu einer gerührten Lösung von 80 g (0.63mol) N-Methyltrifluoracetamid in 160 g (1.63mol) Triethylamin und 150 ml Petrolether 30/50 wurden 162 g (1.5mol) Trimethylchlorsilan getropft und eine weitere Stunde bei Raumtemperatur gerührt. Nach Absaugen des Niederschlags wurde das Filtrat im Ölpumpenvakuum destilliert.
Farblose Flüssigkeit, $Kp.^{760}$=130°C, Ausbeute: 37 g (30%d.Th.).

d) MBTFA.[110)]
In einem 100 ml Dreihalskolben mit Rührer, RückfUßkühler und Trockenrohr wurden 37 g (0.19mol) MSTFA auf o°C gekühlt, dann 50 g (0.24mol) TFAA langsam zugetropft. Nach weiteren zehn Min. Rühren wurde über eine 40 cm Vigreuxkolonne destilliert.
Farblose Flüssigkeit, $Kp.^{760}$=121-124°C, Ausbeute: 25 g (59%d.Th.)

3.3 PRÄPARATIVE DARSTELLUNG DER TRIFLUORACETYLDERIVATE.

3.3.1 1,w-N,N-TRIFLUORACETYLTRYPTAMIN, 1,w-N,N-TRIFLUORACETYL-N-METHYLTRYPTAMIN UND 1-METHYL-w-N-TRIFLUORACETYLTRYPTAMIN.

Das betreffende Indolamin wurde in Dichlormethan gelöst und auf 45°C erwärmt. Zu dieser Mischung in einem 250 ml Kolben mit Rührer , Rückflußkühler und Trockenrohr wurde TFAA auf einmal zugegeben und zwei Stunden gerührt. Nach Beendigung der Reaktion wurden Dichlormethan und überschüssiges TFAA am Rot.-Verdampfer abgezogen.

Der meist dunkelbraune, ölige Rückstand wurde in 150 ml Dichlormethan aufgenommen und zwei Stunden mit pulverisierter Aktivkohle rückflußgekocht. Nach Filtration wurde vollständig abrotiert und der Rückstand aus Ether/n-Hexan umkristallisiert.

Ausgangsverb.	einges. Menge	TFAA	CH_2Cl_2
(2)	2g (12.5mmol)	26.25g (125mmol)	150 ml
(3)	1.5g (8.6mmol)	37.75g (180mmol)	100 ml
(4)	1.2g (7mmol)	22.6g (107mmol)	100 ml

Ausgangsverb.	Aussehen	Fp. (°C)
(2)	farbloses Pulver	153
(3)	weiße Nadeln	59-60
(4)	weiße Nadeln	91

Elementaranalysen:

(23): Ber. C47.74,H2.84,N7.95,F32.36. Gef. C46.65,H2.77,N7.74, F30.65.

(26): Ber. C57.79,H4.82,N10.36,F21.09. Gef. C56.99,H4.26, N10.25,F20.97.

(25): Ber. C49.20,H3.28,N7.65,F31.12. Gef. C49.12,H3.06,N7.51, F30.86.

3.3.2 W,N-TRIFLUORACETYLTRYPTAMIN.

1.1g (6.9mmol) Tryptamin wurden in 100 ml Dichlormethan gelöst, die Lösung auf 45°C erwärmt, dann unter Rühren 30.2 g (144mmol) TFAA zugegeben. Nach zweistündiger Reaktionszeit wurde soweit wie möglich einrotiert, der Rückstand in 100 ml Dichlormethan aufgenommen und 100 ml Diethylamin zugegeben. Nach einstündigem Kochen unter Rückfluß bei 60° C wurde wieder soweit wie möglich eingeengt. Der Rückstand wurde in Ether aufgenommen und eine Stunde mit pulverisierter Aktivkohle rückflußgekocht. Nach Filtrieren und Abrotieren des Ethers wurde aus Ether/n-Hexan umkristallisiert.

Farbloses Pulver, Fp.=92-93°C.

Elementaranalyse: Ber. C56.25,H4.30,N10.92,F28.90. Gef. C56.12, H4.26,N10.90,F28.90.

3.3.3 w-N,N-DIMETHYL-1-TRIFLUORACETYLTRYPTAMIN.

2.1g (11.2mmol) DMT wurden bei 60°C mit 10g (66.2mmol) TFAI versetzt und 20 Minuten gerührt. Überschüssiges Reagenz wurde danach im Vakuum abdestilliert. Der Rückstand wurde in Ether aufgenommen, dabei entstanden zwei Phasen. Die Etherphase wurde destilliert. Schwachgelbes Öl, $Kp._{0.9}$=116°C.

3.4 UMSETZUNG W-N-DIMETHYLIERTER ARYLALKYLAMINE MIT TFAA UND TFA.

Das Amin wurde in 50 ml CH_2Cl_2 gelöst und auf 0°C gekühlt. Unter Ausschluß von Feuchtigkeit wurden zur Lösung in CH_2Cl_2 gelöstes TFAA langsam zugetropft. Nach Entfernen des Eisbades wurde weitere zwei Stunden bei 60°C gerührt. Darauf wurden überschüssiges Reagenz und CH_2Cl_2 abgezogen, der Rückstand in wenig CH_2Cl_2 aufgenommen und eingefroren, wobei farblose, pulvrige Kristalle erhalten wurden.

Ausgangsverbindung	TFAA	Fp.(°C)
DMT 0.7g (3.7mmol)	25.7g(120mmol)	157
N,N-Dimethylphenetylamin 3.7g(25mmol)	30.0g(143mmol)	116-117

Zur Darstellung des N,N-Dimethylphenetylammoniumtrifluoracetates wurde zur Lösung von N,N-Dimethylphenetylamin in Ether ein Überschuß Trifluoressigsäure gegeben und der ausfallende Niederschlag abgesaugt.

Farblose Kristalle, Fp.=42°C.

3.5 UMSETZUNG VON INDOLAMINEN MIT VERSCHIEDENEN DERIVATISIERUNGSREAGENZIEN IM ANALYTISCHEN RAHMEN.

3.5.1 UMSETZUNG MIT TFAA.

Jeweils ca. 2 mg des betreffenden Indolamins wurden im einem 1 ml Reactions Vial mit teflonbeschichteter verschraubbarer Kappe mit 100 µl TFFA versetzt und im Heizblock auf der gewünschten Temperatur gehalten. Bei Umsetzung mit Lösungsmittel wurden vorher 100 µl der betreffenden org. Phase zugegeben.
Nach Beendigung der Reaktion wurde im Stickstoffstrom soweit wie möglich abgeblasen und der Rückstand in 100 µl Essigester aufgenommen.
Bei den Versuchen mit Hilfsbase wurden 1,4-Diazabicyclo(2.2.2)-oktan (DBO) bzw. Triethylamin vor u. nach der Reaktion zugegeben.

3.5.2 UMSETZUNG MIT MBTFA.

Es wurde genauso verfahren wie unter 3.5.1 beschrieben, es wurde aber nicht abgeblasen, sondern direkt eingespritzt.

3.5.3 UMSETZUNG MIT TFAI.

Auch hier wurde auf dieselbe Weise verfahren wie oben. Versuche

zur Entfernung von TFAI : Nach Beendigung der Reaktion wurden Methanol, Tert.-Butylamin, Isopropylamin, Diethylamin zugegeben, danach abgeblasen und der Rückstand in 100 µl Essigester aufgenommen. Diese Lösung wurde gaschromatographisch untersucht.

3.6 ADSORPTION VON INDOLAMINEN AN IRC 50 IONENTAUSCHER.

Vorbehandlung des Ionentauschers: IRC 50 wurde in einer Fritte mit Methanol mehrmals gewaschen, wobei sich das verbrauchte Methanol gelb färbte, dann je zweimal mit o.1 n Natronlauge, Wasser, o.1 n HCl behandelt und wieder neutral gewaschen. Bei Überführung in die Na^+-Form wurde nochmals mit o.1 n Natronlauge gespült und wieder neutral gewaschen. Vor Einfüllen in die Säule wurde der Ionentauscher mit entsprechenden Pufferlösungen auf den gewünschten pH-Wert gebracht und fünf Minuten im Wasserstrahlvakuum entgast.

80 g Ionentauscher wurden dann in die Säule gefüllt und das Probevolumen mit den Indolaminen bei gleichem pH-Wert aufgetragen. Nach Durchlauf desselben wurde mit Wasser gewaschen und anschließend mit dem entsprechenden Puffer bzw. Puffergradientensystem eluiert. Die Desorption der Indolamine wurde über einen angeschlossenen Schreiber mit UV-Detektor verfolgt.

3.7 VERSUCHE MIT XAD-HARZEN.

Vorbehandlung des Harzes: Neues Harz wurde in der Soxlethapparatur je einen Tag mit Aceton und Dichlormethan gereinigt, anschließend mit Pufferlösung auf den pH-Wert des Urins eingestellt, wobei eine Stunde im Wasserstrahlvakuum entgast wurde. Auf dieselbe Weise wurde verbrauchtes Harz regeneriert.
Die Untersuchung der Adsorptions- und Desorptionseigenschaften der Indolamine wurde in wässriger Lösung vorgenommen und mit einem UV-Detektor verfolgt.
Salzfreiheit wurde durch Versetzen einer Eluatprobe mit salpetersaurer $AgNO_3$ - Lösung nachgewiesen. Harnstoffreiheit wurde mit Nitroprussid-Natrium-Kaliumhexacyanoferrat (III) (FCNP) untersucht, wobei mit Harnstoff eine dunkelrote Färbung auftrat.
Darstellung des FCNP-Reagenz:[158] 1 Volumen 10 %ige Natronlauge, 10 %ige Nitroprussidnatriumlösung und 10 %ige Kaliumhexacyanoferrat (III)-lösung wurden mit drei Volumen Wasser gemischt. Vor Gebrauch wurde die Lösung mit dem gleichen Volumen Aceton versetzt.

3.8 BESTIMMUNG DES EXTRAKTIONSGLEICHGEWICHTES.

Die Konzentration der Indolamine im wässrigen Medium wurde UV-photometrisch bei folgenden Wellenlängen gemessen:
Tryptamin 270 nm, DMT und Bufotenin 281.5 nm, Tryptaminpikrat 360 nm. Die Konzentration betrug ca. 6 mg/l Wasser.
Die wässrige Lösung wurde auf den gewünschten pH-Wert gebracht.

10 ml davon wurden in ein Rohr mit Schliffkappe gefüllt und 10 ml des organischen Lösungsmittels zugegeben. Dieses Gemisch wurde 10 Minuten mechanisch geschüttelt. Nach erfolgter Phasentrennung wurde ein Teil der wässrigen Phase in eine UV-Küvette gefüllt. Deren Extinktion wurde mit der Extinktion der Wasserphase vor dem Ausschütteln verglichen. Als Standard (0% Extinktion) diente Wasser.

Bei den Versuchen mit Pikrinsäure wurde dichlormethangesättigtes Wasser verwendet. Die Konzentration betrug hier 15-20 mg/l H_2O.

3.9 URINAUFARBEITUNG UND NACHWEIS VON INDOLAMINEN.

Zu 500 ml Urin wurden die betreffenden Indolamine in der gewünschten Menge zugesetzt und der Harn mit konz. HCl auf pH 1 gebracht. Anschließend wurde in einen 1 l Kolben umgefüllt und 20 Minuten im kochenden Wasserbad verseift. Nach Abkühlen wurde der Urin mit Natriumhydroxid auf pH 10-11 gebracht und filtriert. Zur klaren Lösung wurden 20 g nach 3.7 vorbehandeltes, mit pH 11 - Puffer gesättigtes XAD-4 Harz gegeben. Nach zwanzigminütiger Adsorptionszeit wurde das Harz in eine 15 cm lange, im Durchmesser 2 cm breite Säule gefüllt, welche mit dem unteren Ende an eine Saugflasche mit Wasserstrahlvakuum angeschlossen war. Nach Absaugen des Harns wurde mit 200 ml dest. Wasser im Vakuum gewaschen. Darauf wurde das Vakuum entfernt und mit 70 ml CH_2Cl_2/Methanol/Essigsäure 5:4:1 eluiert.

Das Eluat wurde am Rot.-Verdampfer soweit wie möglich eingeengt und der Rückstand in 25 ml 0.1 n Natronlauge aufgenommen. Diese Lösung wurde dreimal mit je 25 ml Essigsäureethylester extrahiert. Die vereinigten Extrakte wurden auf ca. 15 ml eingeengt, dann mit 3 ml 0.1 n HCl rückextrahiert. Die wässrige Phase wurde erst mit 2 ml Isoamylalkohol ausgeschüttelt, dann mit 10 n Natronlauge auf pH 11 gebracht und dreimal mit je 3 ml Essigester extrahiert.

Der Extrakt wurde auf 100 µl eingeengt und auf eine DC - Kieselgelplatte 0.25 mm bandförmig aufgetragen. Nach Entwickeln mit Methanol und kurzem Trocknen wurde die Platte mit dest. Wasser besprüht und der Bereich R_F 0-0.2 abgekratzt. Das abgekratzte Kieselgel wurde verrieben und die Indolamine mit 3 ml Methanol/25 %igem Ammoniak 9:1 durch maschinelles Schütteln und Zentrifugieren eluiert. Nach Umfüllen des Überstandes wurde dieser nochmals zentrifugiert.

Der Methanol/Ammoniak - Extrakt wurde zur Trockne einrotiert, der Rückstand in Essigester aufgenommen und zur Trockne abgeblasen.

Nach Derivatisieren, erneutem Abblasen und Wiederaufnehmen in 10 µl Essigsäureethylester wurde die Probe eingespritzt.

4. BELEGUNG VON GLASKAPILLARSÄULEN.

4.1 BELEGUNG MIT METHYLSILICON OV 101.

Durch eine 25m lange Duranglassäule(Außendurchmesser 0.8mm, Innendurchmesser 0.3mm) wurden 30 Minuten trockenes HCl aus der Bombe über einen H_2SO_4-Trockenturm geleitet, dann schnell an beiden Enden zugeschmolzen und einen Tag bei 400°C gehalten. Nach Abkühlen und Aufschneiden der Enden wurde mit wässrigem Methanol gewaschen und zwei Stunden bei 150°C im Wasserstoffstrom getrocknet. Darauf erfolgte dynamische Silanisierung mit HMDS: Nach Ansaugen von 25 Windungen HMDS wurde mit 25 Windungen Aceton p.a. nachgespült. Darauf wurde fünf Stunden im Wasserstoffstrom bei 250°C getrocknet. Zur dynamischen Silanisierung wurde eine Bremskapillare mit 20 Windungen verwendet. Die Belegung erfolgte statisch durch Ansaugen von 0.3 % OV 101 in Pentan, Verschließen des einen Endes mit Wasserglas und Abziehen des Pentans im Ölpumpenvakuum, wobei die Säule im Wasserbad thermostatisiert wurde.
Experimentelle Bodenzahl n = 84000.

4.2 BELEGUNG MIT POLYETHYLENGLYKOL CARBOWAX 20 M.

Statt Duran wurde hier eine 25m lange Säule aus Weichglas verwendet. Anrauhen mit HCl, Waschen und Trocknen im Wasserstoffstrom erfolgte auf dieselbe Weise wie unter 4.1 beschrieben. Danach wurden 5 Windungen Aceton, dann 15 Windungen kolloidale

Kieselsäure 0.3 % in Wasser/Aceton angesaugt. Darauf wurde die Säule im Wasserbad thermostatisiert, eine Bremskapillare mit 25 Windungen angehängt und die Flüssigkeit durch Anlegen eines Stickstoffdrucks von 0.2 atü durchgedrückt.
Nach eintägigem Trocknen bei 150°C im Wasserstoffstrom erfolgte statische Belegung mit 0.2 % CW 20 M in Dichlormethan wie unter 4.1 beschrieben.
Experimentelle Bodenzahl n = 75000.

Die experimentelle Bodenzahl wurde durch Einspritzen eines Kohlenwasserstoffgemisches und Ausmessen der Retentionszeit sowie der Halbwertsbreite nach folgender Gleichung bestimmt:

$$n = \left(\frac{t_R}{b_{0.5}}\right)^2 5.54$$

n...Bodenzahl

t_R..Retentionszeit in mm

$b_{0.5}$...Halbwertsbreite

IV. ZUSAMMENFASSUNG.

Im ersten Teil der vorliegenden Arbeit wurde die Struktur der Reaktionsprodukte der Reduktion von Pyridostigmin (1) mit Natriumborhydrid durch spektroskopische Untersuchungen ermittelt. Dabei entstehen neben (12) als Hauptprodukt das stellungsisomere Produkt (13) sowie die völlig gesättigte Verbindung (15).
Die schnellere Hydrolyse von (12) im alkalischen Milieu bei 120°C wurde dabei zur Isolierung und Anreicherung von (13) und (15) benutzt. (15) wurde in reiner Form aus diesem Gemisch durch Hydrierung mit Palladium/Aktivkohle erhalten.
Durch Umsetzung entweder unter alkalischen Bedingungen bei 0-5°C oder besser in organischen Lösungsmitteln konnte eine weitgehend einheitliche Produktführung zugunsten von (12) erreicht werden.
Im analytischen Rahmen war die letztere Methode allerdings nicht anwendbar, da nach der Ionenpaarreaktion von Pyridostigmin die dazu verwendete Pikrinsäure die Reaktion störte. Die Bestimmung von Pyridostigmin aus Blutserum glückte auf folgende Weise: Ausfällen des Eiweißes durch Zugabe von HCl und Abtrennung durch Zentrifugieren, anschließend Reduktion durch Zugabe von Natriumborhydrid bei pH 11, Extraktion mit Tert.-Butylmethylether, Rückextraktion mit HCl und schließlich erneute Extraktion mit Essigsäureethylester bei pH 11. Darauf gaschromatographische Analyse.
Die Erfassungsgrenze bei Verwendung eines FID ergab sich zu 1 µg Pyridostigmin pro ml Blutserum.

Im zweiten Teil der Arbeit wurden Möglichkeiten zur Aufarbeitung und anschließender Derivatisierung von Indolaminen im Harn zu deren gaschromatographischem Nachweis untersucht. (Verbindungen 2-9, Seite 3).

(2) bis (6) konnten bei 60°C/10Min. mit TFAA in Dichlormethan zu eindeutigen Produkten trifluoracetyliert werden, es entstanden die zweifach trifluoracetylierten Verbindungen. Bei (4) trat Trifluoracetylierung am Seitenkettenstickstoff ein.

Die Derivate wurden im präparativen Maßstab hergestellt, sie erwiesen sich als stabile kristalline Verbindungen.

(7) bis (9) reagierten mit TFAA unter Trifluoracetylierung der tertiären Aminogruppierung zum quartären $-N(CH_3)_2COCF_3^+ \; CF_3COO^-$ und waren damit dem gaschromatographischen Nachweis entzogen. Das Vorliegen dieser Struktur konnte durch spektroskopische und physikalische Methoden belegt werden, wobei bis jetzt offenbleibt, ob die oben formulierte salzartige Struktur oder eine nicht klassische bzw. eine rasch äquilibrierende Struktur (s.S. 67) vorliegt. Zumindest in Lösung kann keine salzartige Formation mit unterschiedlichen Trifluoracetylresten vorliegen.

Die Derivatisierung am Indolstickstoff bei (7) bis (9) verläuft erfolgreich mit MBTFA bei 95°C/2h. (2) bis (6) ergaben bei dieser Temperatur bereits nach einer Stunde die gewünschten einheitlichen Derivate, nach zwei Stunden aber Gemische, sodaß keine gemeinsame Derivatisierung von (2) bis (9) auf diese Weise möglich war.

Durch Verwendung von TFAI bei 60°C/20Min. konnte dies erreicht werden, das nicht abblasbare Reagenz störte jedoch im

Gaschromatogramm erheblich und war auf keine Weise sauber entfernbar.

Zur Isolierung der Indolamine aus dem Harn erwies sich die Anwendung von XAD-4 Harz als einfache und bequeme Methode. Das Harz wurde dabei im Batchverfahren zugegeben, nach 20 Min. in eine Säule gefüllt und mit Wasser gespült. Die Elution der Indolamine erfolgte mit Dichlormethan/Methanol/Eisessig 5:4:1. Die anschließenden Extraktionsverfahren brachten eine weitgehende Reinigung des Extraktes. Vor allem das Ausschütteln der wässrigen sauren Phase mit Isoamylalkohol entfernte die störenden Farbstoffe fast vollständig. Darauf erfolgte Extraktion der auf pH 11 gebrachten wässrigen Lösung mit Essigsäureethylester.
Es erwies sich als notwendig, noch einen dünnschichtchromatographischen Trennungsschritt einzubauen. Die Entwicklung auf der 0.25 mm starken Kieselgelplatte erfolgte mit Methanol, die Indolamine blieben dabei unten liegen, während die Verunreinigungen weiterliefen. Die abgekratzte Kieselgelzone wurde dann mit Methanol/Ammoniak 25% 9:1 eluiert.
Nach diesen Aufarbeitungsgängen sowie anschließender Derivatisierung konnten (2), (3) und (7) gaschromatographisch im Bereich 1 µg/500 ml Urin schon bei Verwendung eines FID eindeutig nachgewiesen werden. Chromatogramme mit besonders wenig Untergrund wurden bei Verwendung eines ECD erhalten. Hier sollte eine Nachweisgrenze von 10-50 ng mit den in dieser Arbeit entwickelten Methoden möglich sein.

V. LITERATUR.

1) V. Horstmann: Diplomarbeit Tübingen 1981.

2) G.J. Yakatan, Iy Yean-Tien: J. Chrom. 164, 399 (1979).

3) K. Chan, D. Williams, I.D. Bathy, T.N. Calvey: J. Chrom. 120, 349 (1976).

4) K. Chan, A. Deghan: J. Pharmacol. Meth. 1, 311 (1976).

5) J.L.W. Pohlmann, S.L. Cohan: J. Chrom. 131, 297 (1977).

6) M.G.M. De Ruyter, R. Cronelly, N. Castagnoli jr.: J. Chrom. 183, 193 (1980).

7) Aldrich Library of NMR-Spectra, Vol. II, Aldrich Chem. Comp. Inc. 1974.

8) E. Pretsch, T. Clerc, J. Seibl, W. Simon: Tabellen zur Strukturaufklärung org. Verb., 2. Aufl., Springer 1981.

9) E. Breitmaier, G. Bauer: ^{13}C-NMR-Spektroskopie, Thieme Stuttgart 1977.

10) U. Eisner, J. Kuthan: Chem. Rev. 72(1), 35 (1972).

11) D.S. Grierson, M. Harris, H.P. Husson: J. Am. Chem. Soc. 102, 1064 (1980).

12) R.E. Lyle, P.S. Anderson: Adv. Heterocycl. Chem. 6, 45 (1966).

13) K. Schenker: Angew. Chem. 72, 638 (1960).

14) P.S. Anderson, R.E. Lyle: Tetrahedr. Lett. 3, 153 (1964).

15) Z. Ksandr, Z. Samek, V. Spirko, M. Ferles: Collect. Czech. Chem. Commun. 31, 3003 (1966).

16) K.O. Borg, D. Westerlund: Z. Anal. Chem. 252, 275 (1970).

17) A. Klöppel, D. Post, G. Schneider, H. Schütz: Z. Anal. Chem. 252, 279 (1970).

18) S. Eksberg, G. Schill: Anal. Chem. 45, 2092 (1973).

19) K. Jungermann, H. Möhler: Biochemie, 1. Aufl., Springer Berlin 1980.

20) L.E. Hollister in : Neuroregulators and psychiatr. Disorders, S. 550, E. Usdin Herausg. ,Oxford University Press 1977.

21) A.A. Boulton: Nature 231, 22 (1971).

22) D. Ecclestone: Adv. in Neuropsychopharm. 79 (1971).

23) H. Osmond, J. Smithies: J. Ment. Sci. 98, 309 (1952).

24) E.F. Domino: Neurotransmitter Balances, Regul. Behav., ed. by E.F. Domino, Ann Arbor 1975, S. 185.

25) J.C. Gillin, G.M. Stoff, R.J. Wyatt: Psychopharmacol., ed. by E.A. Lipton, Raven Press New York 1978, S. 1097.

26) W. Pollin, P.V. Cardon, S.S. Kety: Science 133, 104 (1961).

27) J. Axelrod: J. Pharmacol. Exp. Ther. 138, 28 (1961).

28) N. Narasimhachari, R.J. Lin, J. Plaut, K. Leiner: J. Chrom. 86, 123 (1973).

29) J.F. Lipinsky, L.R. Mandel, H.S. Ahn, W.J.A. Vanden Heuwel, R.W. Walker: Biol. Psych. 9, 89 (1974).

30) J. Kaplan, L.R. Mandel, R. Stillman, R.W. Walker, W.J.A. Vanden Heuwel, J.C. Gillin, R.J. Wyatt: Psychopharmacol. 38, 239 (1974).

31) R.J. Wyatt, J.C.Gillin et al.: Adv. Biochem. Psychopharm. 11, 299 (1974).

32) L.R. Mandel: Neurotransmitter Balances, Regul. Behaviours, ed. by E.F. Domino, Ann Arbor 1975.

33) J.C. Gillin, J. Kaplan, R. Stillman, R.J. Wyatt: Am. J. Psych. 133(2), 203 (1976).

34) B.M. Twarog, I.H. Page: Am. J. Physiol. 175, 157 (1953).

35) F.M. Bumpus, I.H. Page: J.Biol. Chem. 212, 111 (1955).

36) R. Rodnight: Biochem. 64, 621 (1956).

37) E. Fischer, T.A. Fernandez Lagravere, A.J. Vazquez, A.O. Di Stefano: J. Nerv. Ment. Disease 133, 441 (1961).

38) H. Sprince, C.M. Parker, D. Jameson, F. Alexander: J. Nerv. Ment. Disease 137, 246 (1963).

39) M. Siegel: J. Psychiat. Res. 3, 205 (1965).

40) R.M. Fleming, W.G. Clark, E.D. Fenster, J.C. Towne: Anal. Chem. 37, 692 (1965).

41) H. Gross, G. Franzen: Biochem. Zeitschrift 340, 403 (1964).

42) H. Gross, G. Franzen: Nature 206, 1052 (1965).

43) T.M. Runge et al.: J. Nerv. Ment. Disease 142, 470 (1966).

44) H. Tanimukai: J. Chrom. 30, 155 (1967).

45) H. Tanimukai, R. Ginther, J. Spaide, J.R. Bueno, H.E. Himwich: Recent Adv. in Biol. Psychiat. 10, 6 (1968).

46) H. Tanimukai, R. Ginther, J. Spaide, J.R. Bueno, H.E. Himwich: Brit. J. Psychiat. 117, 421 (1970).

47) H. Rosengarten, A. Szemis, A. Piotrowski, K. Romaszewska, H. Matsumoto, K. Stencka, A. Jus: Psychiat. Pol. 4, 519 (1970).

48) P. Baumann, N. Narasimhachari: J. Chrom. 86, 269 (1973).

49) P. Baumann, B. Scherer, W. Krämer, N. Matussek: J. Chrom. 59, 463 (1971).

50) N. Narasimhachari, J. Avalos, M. Fujimori, H.E. Himwich: Biol. Psych. 5(3), 311 (1972).

51) N. Narasimhachari, H.E. Himwich: J. Psychiat. Res. 9, 113 (1972).

52) S. Axellson, L. Nordgren: Life Sciences 14, 1261 (1974).

53) J.M. Shingsby, A.A. Boulton: J. Chrom. 123, 51 (1976).

54) N. Narasimhachari, H.E. Himwich: Life Sciences 12, 475 (1973).

55) T.G. Bidder, L.R. Mandel, H.S. Ahn, W.J.A. Vanden Heuwel, R.W. Walker: Lancet I, 165 (1974).

56) M.R. Boarder, M.C.H. Oon, R. Rodnight: Biochem. Pharmacol. 25, 2109 (1976).

57) B. Angrist, R.W. Walker: Psychopharmacol. 47, 29 (1976).

58) M.C.H. Oon, R.M. Murray, R. Rodnight, M.P. Murphy, J.L.T. Birley: Psychopharmacol. 54, 171 (1977).

59) S.T. Christian, R. Harrison, E. Quaile, J. Pagel, J. Monti: Biochem. Med. 18, 164 (1977).

60) L. Corbett, S.T. Christian, R.D. Morin, F. Benington, J.R. Smythies: Brit. J. Psychiat. 132, 139 (1978).

61) M.C.H. Oon, R. Rodnight: Biochem. Med. 18, 410 (1977).

62) R.M. Murray, M.C.H. Oon, R. Rodnight, J.L.T. Birley, A. Smith: Arch. Gen. Psychiat. 36, 644 (1979).

63) M. Räisänen, J. Kärkainen: J. Chrom. 162, 579 (1979).

64) R.W. Walker, L.R. Mandel, J.E. Kleinman, J.C. Gillin, R.J. Wyatt, W.J.A. Vanden Heuwel: J. Chrom. 162, 539 (1979).

65) J.R. Smythies, R.D. Morin, G.B. Brown: Biol. Psych. 14, 549 (1979).

66) T.R. Bossin, G. Jonsson, O. Beck: Brain Res. 173, 79 (1979).

67) O. Beck, T.R. Bossin: Biomed. Mass Spectrom. 6, 19 (1979).

68) B.W. Wilson, W. Snedder: J. Neurochem. 33, 939 (1979).

69) F. Artigas, E. Gelpi: Anal. Biochem. 92, 233 (1979).

70) S. Sasa, L. Le Roy Blank: Anal. Chim. Acta 104, 29 (1979).

71) F. Ponzio, G. Jonsson: J. Neurochem. 32, 129 (1979).

72) H. Nakamura, J.J. Pisano: J. Chrom. 152, 167 (1978).

73) H. Nakamura, J.J. Pisano: J. Chrom. 152, 153 (1978).

74) E.J. Cowles, G.M. Christensen, A.C. Hildung: J. Chrom. 35, 389 (1968).

75) K. Seiler, K. Bruder: J. Chrom. 106, 159 (1975).

76) D. Aures, R. Fleming, R. Hakanson: J. Chrom. 33, 480 (1968).

77) E. Dworcack, M. Huck: J. Chrom. 61, 162 (1971).

78) F. Artigas, E. Gelpi, E. Martinez: J. Chromat. Science 20, 75 (1982).

79) F. Segura, F. Artigas, E. Martinez, E. Gelpi: Biomed. Mass Spectrom. 3, 91 (1976).

80) C. Sunol, E. Gelpi: J. Chrom. 142, 559 (1977).

81) P. Christiansen: Chromatographia 8(9), 463 (1975).

82) E. Martinez, E. Gelpi: J. Chrom. 167, 77 (1978).

83) D.A. Durden, B.A. Davis, A.A. Boulton: Biomed. Mass Spectrom. 1, 83 (1974).

84) E. Gelpi, E. Peralta, J. Segura: J. Chromatogr. Science 12, 701 (1974).

85) N. Narasimhachari, P. Vouros: Biomed. Mass Spectrom. 367 (1974).

86) J. Drozd: J. Chrom. 113, 303 (1975).

87) W. Borsche, H. Groth: Ann. 549, 238 (1941).

88) V.O. Illy: Synthesis 387, (1979).

89) K. Blau, G. King: Handbook of Derivatives for Chrom., 2. Aufl. Heyden & Son , London 1978.

90) A. Cipiciani, S. Clementi, P. Linda, G. Savelli, G.V. Sebastiani: Tetrahedron 32, 2595 (1976).

91) R.P. Corbally, M.J. Perkins: J.C.S. Chem. Commun. 779 (1978).

92) A. Cipiciani, S. Clementi, P. Linda: J.C.S. Perkin Trans. 523 (1982).

93) T.G. Bronner: Adv. Carbohydrate Chem. 16, 59 (1961).

94) A.S. Bailey, J.M. Peach, H.H. Vandrevala: J.C.S. Chem. Commun 845 (1978).

95) H. Schuttenberg, R.C. Schulz: Angew. Chem. 88, 848 (1976).

96) G. Belvedere, S. Caccia, A. Frigerio, A. Jori: J. Chrom. 84, 355 (1973).

97) D.D. Clark, S. Wilk, S.E. Gitlow, H.J. Franklin; J. Gas Chrom. 5, 307 (1967).

98) V. Gold, E.G. Jeffman: J. Chem. Soc. 1409 (1953).

99) G.H. Schenk, P. Wines, C. Mojzis: Anal. Chem. 36, 914 (1964).

100) A.R. Fersht, W.P. Jenks: J. Am. Chem. Soc. 19, 5432 (1970).

101) T.G. Bonner, K. Hiller: J.C.S. Perkin Trans II, 1828 (1973).

102) A.R. Butler, I.H. Robertson: J.C.S. Perkin Trans II, 660 (1975).

103) A. Hassner, L.R. Krepsky, V. Axelanian: Tetrahedron 34, 2069 (1978).

104) E. Guibe-Jampel, G. Le Corre, M. Wakselman: Tetrahedr. Lett. 13, 1157 (1979).

105) W.E. Doering, W.E. Mc Ewen: J. Am. Chem. Soc. 73, 2104 (1951).

106) G. Höfle, W. Steglich, H. Vorbrüggen: Angew. Chem. 90, 602 (1978).

107) H. Adkins, Q.E. Thompson: J.Am. Chem. Soc. 71, 2242 (1949).

108) V.I. Rybachenko et al.: Zh. Org. Khim. 12 (1), 240 (1976). CA: 84, 120737 b.

109) D. Cook: Can. J. Chem. 40, 2362 (1962).

110) M. Donike: J. Chrom. 78, 273 (1973).

111) M. Donike, R. Gola, L. Jaenicke: J. Chrom. 134, 385 (1977).

112) J. Vessman, A.M. Moss, M.G. Horning, E.C. Horning: Anal. Lett. 2, 81 (1969).

113) H.A. Staab, A. Mannschreck: Chem. Ber. 95, 1284 (1962).

114) H.A. Staab, M. Lüking, F.H. Dürr: Chem. Ber. 95, 1275 (1962).

115) A. Zeeman, I.P.G. Wirotama: Z. Anal. Chem. 247, 158 (1969).

116) H. Auterhoff: Lehrbuch der pharmazeut. Chemie, 9. Aufl., Wissenschaftl. Verlagsges. Stuttgart 1978.

117) H. Wisser, E. Knoll: Z. Klin. Chem. Klin. Biochem. 11, 3 (1973).

118) M. Greer, T.F. Sprinkle, C.M. Williams: Clin. Chem. Acta 21, 947 (1968).

119) J.J. Pisano: Clin. Chim. Acta 5, 406 (1960).

120) V. Talasek: Collect. Czech. Chem. Commun. 33, 731 (1968).

121) P. Jandera, J. Churazek: J. Chrom. 98, 1 (1974).

122) N. Seiler: J. Chrom. 143,221 (1977).

123) J. Feitelson: Ion Exchange, Vol. II, S. 135 , ed. by J.A. Marinsky , 2. Aufl. 1969.

124) R.L. Robertus: Anal. Chem. 38, 1089 (1966).

125) D.K. Hale, D.I. Packham, K.W. Pepper: J. Chem. Soc. 844 (1953).

126) G. Schill: Pharmacia 28, 713 (1973).

127) Y. Dalmaz, L. Peyrin: J. Chrom. 116, 379 (1976).

128) T. Seki: J. Chrom. 155, 415 (1978).

129) J. Awapara, V.E. Davis, O. Graham: J. Chrom. 3, 11 (1960).

130) R.A. Wall: J! Chrom. 60, 195 (1971).

131) K. Blau: Biochem. J. 80, 193 (1961).

132) I.A. Michaelson, P.Z. Coffman: Anal. Biochem. 27, 257 (1969).

133) J. Häggendal: Scand. J. Clin. a. Lab. Invest. 14, 537 (1962).

134) T. Seki, H. Wada: J. Chrom. 114, 227 (1975).

135) L.L. Zaika: J. Chrom. 49, 222 (1970).

136) G. Ibrahim, S. Andryauskas, M.L. Bastos: J. Chrom. 108, 107 (1975).

137) G.A. Junk et al.: J. Chrom. 99, 745 (1974).

138) W. Vycudilik: J. Chrom. 111, 439 (1975).

139) M.P. Kullberg et al.: Biochem. Med. 7, 323 (1979).

140) J.C. Janson: J. Chrom. 28, 12 (1967).

141) B. Gelotte: J. Chrom. 3, 330 (1960).

142) E. Änggard, G. Sedvall, B. Stöquist: J. Chrom. 52, 87 (1970).

143) S.F. Contractor, P. Jomaier: Clin. Chim. Acta 14, 535 (1966).

144) M. Donike, J. Bernbach: Z. Anal. Chem. 279, 128 (1976).

145) J.A. Riddick, W.B. Bunger: Organic Solvents, 3. Aufl., S. 749 Wiley Interscience.

146) H.M. Wuest, E.H. Sakal: J. Am. Chem. Soc. 73, 1210 (1951).

147) L.I. Smith, R.R. Holmes: J. Am. Chem. Soc. 73, 4296 (1951).

148) M.E. Speeter, W.C. Anthony: J. Am. Chem. Soc. 76, 6208 (1954).

149) F. Benington, R.D. Morin, L.C. Clerk jr.: J. Org. Chem. 23, 1977 (1958).

150) M. Nimtz: Diplomarbeit Tübingen 1980.

151) J.K. Horner, W.A. Skinner: Can. J. Chem. 44, 315 (1965).

152) E.J. Bourne et al.: J. Chem. Soc. 2976 (1949).

153) H.A. Staab, G. Walther: Chem. Ber. 95, 2070 (1962).

154) H.A. Staab: Ann. 609, 81 (1957).

155) H.A. Staab, W. Rohr in W. Foerst (Ed.): Neue Methoden der präp. org. Chemie Bd V, S. 53, Verlag Chemie, Weinheim 1967.

156) E.R. Bisell, M. Finger: J. Org. Chem. 24, 1256 (1959).

157) M. Donike: J. Chrom. 42, 103 (1969).

158) J. Roche et al.: Biochem. Biophys. Acta 14, 71 (1954).

LEBENSLAUF.

28. 10. 1953	Geboren in Stuttgart als Sohn des Dipl. Ing. Karl Horstmann und dessen Ehefrau Agnes, geb. Neher. Damaliger Wohnort der Familie: Eßlingen/Neckar.
1956	Umzug von Eßlingen nach Altensteig im Schwarzwald.
April 1960- April 1964	Besuch der Grundschule in Altensteig.
8. 4. 1964	Eintritt in die Jugenddorf-Christophorusschule am selben Ort.
20. 6. 1972	Ablegen der Reifeprüfung an diesem Gymnasium.
1. 1. 1973- 31. 3. 1974	Grundwehrdienst zunächst in Weingarten, dann in Nagold.
SS 1974 und WS 1974/75	Immatrikulation an der Eberhard-Karls-Universität Tübingen für den Studiengang Physik.
SS 1975	Abbruch des Physikstudiums und Beginn des Chemiestudiums.
Oktober 1977	Vordiplomprüfung in Chemie.
September 1980	Diplomprüfung in Chemie.
Oktober 1980- Mai 1981	Anfertigung der Diplomarbeit unter Anleitung von Herrn Prof. Dr. G. Häfelinger: "Versuche zur quantitativen Bestimmung von Pyridostigmin im Blutplasma."

Juni 1981-

Juli 1983 Experimenteller Teil der hier vorliegenden Dissertation "Aufarbeitung und Derivatisierung von Aminen zum gaschromatographischen Nachweis aus biologischen Flüssigkeiten" unter Anleitung von Herrn Prof. Dr. G. Häfelinger am Institut für org. Chemie der Eberhard-Karls-Universität Tübingen.

Meine akademischen Lehrer waren

Frau Professor Dr. S. KemmLer-Sack und die Herren Professoren E. Bayer, G. Häfelinger, H.P. Hagenmaier, M. Hanack, W. Braun, G. Gauglitz, F. Gönnenwein, D. Krug, U. Kunze, E. Lindner, I.P. Lorenz, H. Oberhammer, D. Oelkrug, H. Pauschmann, G. Pausewang, A. Rieker, W. Rüdorff, W. Rundel, V. Schurig, A. Schwenk, F.F. Seelig, J. Strähle, H. Suhr, W. Zeil, H. Stegmann, W. Voelter.

ifo druck
laubanger 15
8600 bamberg
tel.: 0951/6 43 21